

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Inhibition von α_v Integrinen vermindert die Migration von primären glatten
Gefäßmuskelzellen und schwächt die Tyrosinphosphorylierung
der „focal adhesion kinase“**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Hupp

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2007

Referent: Prof. Dr. med. G. Ertl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Strotmann

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 16.10.2007

Der Promovend ist Arzt.

1. Einleitung	1
1.1 Die ischämische Herzerkrankung als häufige Todesursache	1
1.2 Manifestationsformen und Therapie der ischämischen Herzerkrankung	2
1.3 Perkutane transluminale Koronarangioplastie	4
1.4 Komplikationen der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie und der Stentimplantation	5
1.5 Pathophysiologie der Restenosierung nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie und nach Stentimplantation	8
1.6 Verminderung der Restenose durch Medikamente-freisetzende Stents	10
1.7 Rolle der Integrinrezeptoren in der Restenoseentstehung	10
2. Zielsetzung der Doktorarbeit	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Verwendete Zellart	14
3.1.2 Medien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultivierung	14
3.1.3 Antikörper	15
3.1.4 Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien für Zellkulturversuche	17
3.1.5 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western Blot Analysen	18
3.1.6 Chemikalien und Kits	19
3.1.7 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	20
3.2 Methoden	22
3.2.1 Zellkultivierung	22
3.2.2 Einfrieren der primären Gefäßmuskelzellen	22
3.2.3 Auftauen der primären Gefäßmuskelzellen	23

3.2.4 Bestimmung der in einer Suspension enthaltenen Zellanzahl	23
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen	24
3.2.6 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	25
3.2.7 Signaltransduktions Versuche	26
3.2.8 Zellysate	27
3.2.9 Immunpräzipitation	27
3.2.10 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese	28
3.2.11 Western Blot Analysen	29
3.2.12 Adhäsions Versuche	30
3.2.13 Migrations Versuche	31
4. Ergebnisse	33
4.1 Charakterisierung der primären glatten Gefäßmuskelzellen	33
4.1.1 Nachweis des Proteins „SMC Actin“	33
4.1.2 Expression der Integrine $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$	35
4.1.3 Weitere Charakterisierung der Gefäßmuskelzellen durch Immunfluoreszenzfärbungen	37
4.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion	39
4.2.1 Stimulation der Gefäßmuskelzellen durch Adhäsion auf Vitronektin	40
4.2.2 Lokalisation des Phosphotyrosin- und FAK-Antikörpersignals intrazellulär	42
4.2.3 Stimulation der Gefäßmuskelzellen durch Adhäsion auf Vitronektin, Fibronectin und Kollagen	43
4.2.4 Untersuchung der induzierten Tyrosinphosphorylierung nach Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin, Fibronectin und Kollagen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	45
4.2.5 Einfluss des Integrininhibitors Cilengitide auf die induzierte Tyrosinphosphorylierung bei Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin	47

4.2.6 Identifikation des 116 kDa Proteins mittels Immunpräzipitation	48
4.2.7 Untersuchung der Veränderungen durch Cilengitide bei Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	50
4.2.8 Cilengitide Wirkung bei Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Kollagen und Fibronektin	51
4.2.9 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf kultivierte adhärenente Gefäßmuskelzellen	53
4.2.10 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf das Aktinzytoskelett und die Tyrosinphosphorylierung kultivierter adhärenter Gefäßmuskelzellen	56
4.3 Adhäsions Experimente	58
4.3.1 Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit den Proteinen Fibronektin, Kollagen und Vitronektin beschichteten Oberflächen	59
4.3.2 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf die Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit Vitronektin beschichteten Oberflächen	61
4.3.3 Einfluss des Inhibitors auf die Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit Kollagen und Fibronektin beschichteten Oberflächen	62
4.4 Boyden Kammer Migrationsversuche	64
4.4.1 Migration der Gefäßmuskelzellen unter Stimulation mit dem Protein Vitronektin	65
4.4.2 Stimulation der Migration durch Vitronektin, Kollagen und Fibronektin	66
4.4.3 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf die durch Vitronektin induzierte Migration	68
4.4.4 Cilengitide Wirkung bei Stimulation der Migration durch Kollagen bzw. Fibronektin	70
5. Diskussion	72
6. Zusammenfassung	77

7. Literaturverzeichnis	79
8. Verwendete Abkürzungen	85

1. Einleitung

1.1 Die ischämische Herzerkrankung als häufige Todesursache

Im Jahr 2002 stellte die ischämische Herzerkrankung (IHK), laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die häufigste Todesursache bei über 60 jährigen Erwachsenen weltweit dar. Auch in der Population der zwischen 15 bis 59 jährigen lag diese Erkrankung nach AIDS auf Platz zwei der zum Tode führenden Erkrankungen (siehe Abb. 1 A). In Bezug auf die Krankheitslast in der Bevölkerung war die ischämische Herzerkrankung bei über 60 jährigen Patienten führend, bei den 15 – 59 jährigen Erwachsenen lag sie auf Platz fünf (siehe Abb. 1B) [1].

A.

Todesfälle im Jahr 2002 weltweit unter Erwachsenen					
Im Alter von 15 – 59 Jahre			im Alter ab 60 Jahre		
	Erkrankung	Todesfälle		Erkrankung	Todesfälle
1.	HIV/AIDS	2279000	1.	Ischämische Herzerkrankung	5825000
2.	Ischämische Herzerkrankung	1332000	2.	Cerebrovaskuläre Erkrankungen	4689000
3.	Tuberkulose	1036000	3.	Chronische obstruktive Lungenerkrankung	2399000
4.	Verkehrsunfälle	814000	4.	Infektionen des unteren Respirationstraktes	1396000
5.	Cerebrovaskuläre Erkrankungen	783000	5.	Malignome im Bereich der Trachea, der Bronchien und der Lunge	928000

B.

Krankheitslast im Jahr 2002 weltweit unter Erwachsenen					
im Alter von 15 – 59 Jahre			im Alter ab 60 Jahre		
	Erkrankung	DALYs		Erkrankung	DALYs
1.	HIV/AIDS	68661000	1.	Ischämische Herzerkrankung	31481000
2.	Depressive Erkrankungen	57843000	2.	Cerebrovaskuläre Erkrankungen	29595000
3.	Tuberkulose	28380000	3.	Chronische obstruktive Lungenerkrankung	14380000
4.	Verkehrsunfälle	27264000	4.	M. Alzheimer und andere Demenzerkrankungen	8569000
5.	Ischämische Herzerkrankung	26155000	5.	Katarakte	7384000

DALYs (Disability adjusted life years) = um Behinderungen bereinigte Lebensjahre, als Indikator für die Zeit, die in Behinderung verlebt wird oder durch vorzeitige Sterblichkeit verloren geht

Abb. 1: Todesfälle und Krankheitslast nach Erkrankungen bei Erwachsenen weltweit im Jahr 2002 (modifiziert nach [1])

1.2 Manifestationsformen und Therapie der ischämischen Herzerkrankung

Die ischämische Herzkrankheit manifestiert sich erstmals zu 40 % als Angina pectoris (AP), zu 40 % als Herzinfarkt und zu 20 % als plötzlicher Herztod. Pathophysiologisch liegt dieser Erkrankung eine Atherosklerose und Stenosierung von Koronararterien zu Grunde, wodurch die erforderliche Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur unter Belastung bzw. später auch in Ruhe nicht mehr gewährleistet ist. Man unterteilt die IHK, oder auch synonym koronare Herzkrankheit (KHK) genannt, in die stabile Angina pectoris und das akute koronare Syndrom (ACS). Unter die Entität des ACS fällt die instabile Angina pectoris, der Herzinfarkt ohne ST-Hebung (NSTEMI) im EKG, der Herzinfarkt mit ST-Hebung (STEMI) und der plötzliche Herztod. Unter einer instabilen AP versteht man jede erstmals aufgetretene AP, eine an Schwere, Dauer oder Häufigkeit zunehmende AP, eine AP in Ruhe, sowie eine AP mit zunehmendem Bedarf an antiangiösen Medikamenten. Während die stabile Angina pectoris konservativ behandelt werden kann, stellt das ACS eine Notfallsituation dar. Hierbei sollte der Patient, neben der konservativen Basistherapie und der nicht invasiven Diagnostik, einer Koronarangiographie mit der Möglichkeit einer Revaskularisation des verengten bzw. verschlossenen Gefäßes zugeführt werden [2]. Einen Überblick über das klinische Prozedere bezüglich der Diagnosefindung und Risikostratifizierung des ACS gibt die nachfolgende Abbildung, welche den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie entspricht [3]. Bei akutem koronarem Syndrom mit ST Hebung oder neuem Linksschenkelblock im 12 Kanal EKG muss hiernach sofort eine Koronarangiographie mit Interventionsmöglichkeit durchgeführt werden. Ohne ST Hebung im EKG ergibt sich bei dem Vorliegen von Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, einer Troponinerhöhung, einer signifikanten ST Streckensenkung, einer therapierefraktären Symptomatik, einer hämodynamischen oder Rhythmusinstabilität die Indikation einer invasiven Herzkatheterdiagnostik frühelektiv innerhalb von 48 Stunden. Ohne dem Vorliegen von Risikofaktoren und einer erfolgreichen konservativen Therapie mit Symptommfreiheit sollte sich zunächst eine nichtinvasive Diagnostik mittels z. B. Belastungs EKG anschliessen. Die invasive Diagnostik kann dann zur definitiven Abklärung und evtl. Behandlung vorliegender Stenosen folgen bzw. sollte sich einem positiven Belastungstest anschliessen.

Patient mit akutem Koronarsyndrom

Angina >20 min in ärztlicher Begleitung



Krankenhauseinweisung

12-Kanal EKG innerhalb 10 min
Troponin sofort, Ergebnis < 60 min
Anamnese und Untersuchung

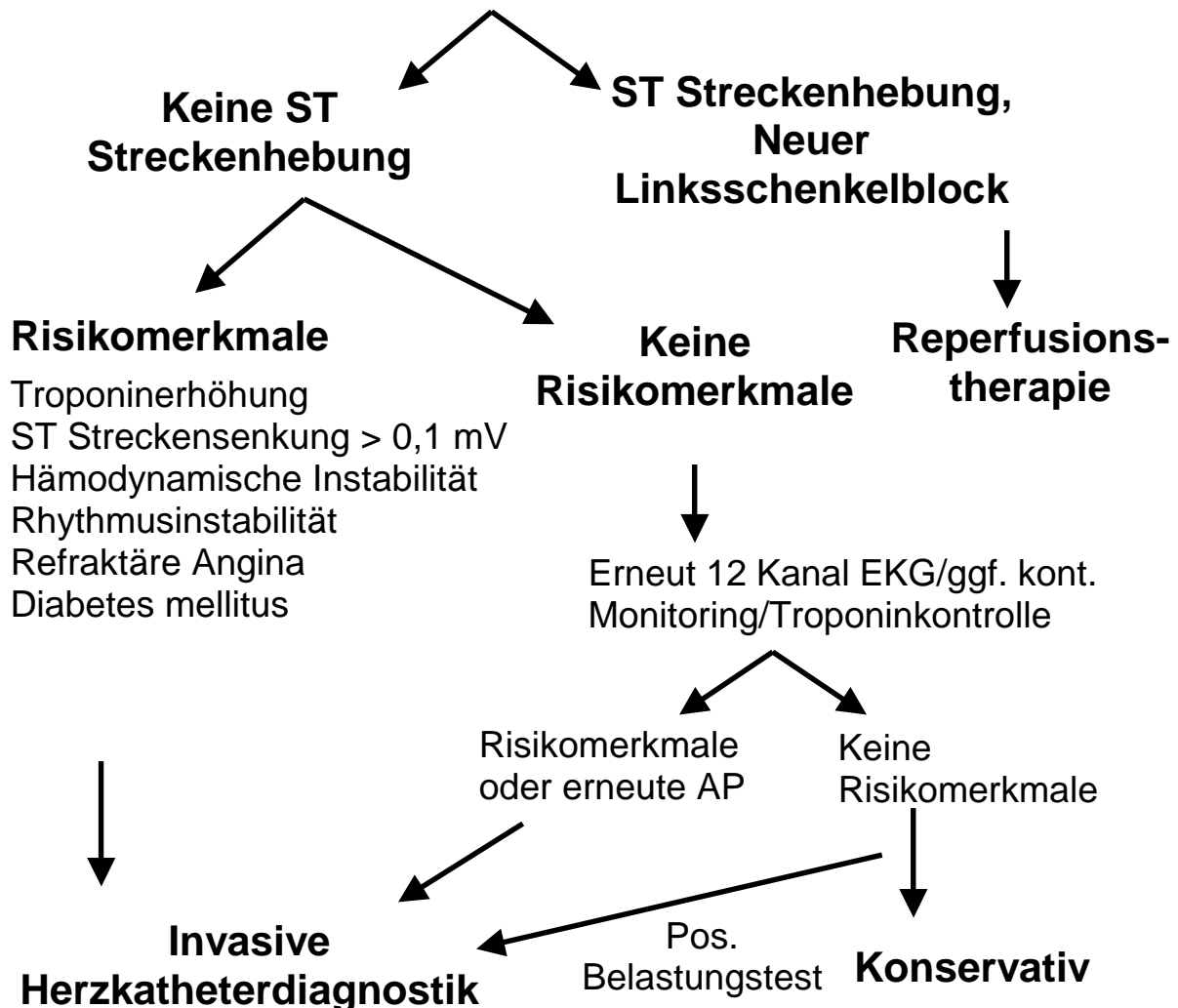


Abb. 2 Algorithmus zu Diagnosefindung und Risikostratifizierung des ACS (modifiziert nach [3])

1.3 Perkutane transluminale Koronarangioplastie

Während bei einigen Befunden, wie z.B. einer signifikanten Hauptstammstenose der linken Koronararterie, einer symptomatischen 3-Gefässerkrankung oder einer 2-Gefässerkrankung mit Hauptstammäquivalent, nach wie vor die operative Koronarrevaskularisation mittels z.B. Bypassoperation indiziert ist [2], nimmt die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) immer mehr an Bedeutung zu. Einen Überblick über die klinischen Indikationen für die Durchführung einer Koronarangiographie mit evtl. PTCA gibt Abb. 3 [4]. So sollte eine Koronarangiographie mit evtl. sich anschließender Intervention nach objektiven Ischämiezeichen in anderen Untersuchungen, wie z.B. Belastungs EKG oder auch Szintigraphie, erfolgen. Die Indikationen wurden auch schon in Bezug auf die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie im vorhergehenden Abschnitt besprochen. Dieses Verfahren wurde erstmals im Jahre 1977 von Andreas Grüntzig eingesetzt. Man geht hierbei über einen arteriellen Zugang, typischerweise über die rechte Femoralarterie, retrograd mit einem Katheter durch die Aorta bis in die Koronargefäße vor. Dort können mittels Kontrastmittelinjektion die Gefässsituation und evtl. bestehende Stenosen dargestellt werden, und gegebenenfalls mit einem Interventionskatheter, der u. a. einen aufblasbaren Ballon enthält, diese Verengungen dilatiert werden. Durch die stetige technische Weiterentwicklung verminderte sich die Komplikationsrate dieses Verfahrens [4]. In der Bundesrepublik Deutschland nahm die Anzahl der durchgeführten Koronarangiographien von 56797 auf 652781, und die Anzahl der hierbei durchgeführten Koronarinterventionen von 2809 auf 221867 im Zeitraum von 1984 bis 2003 zu. [5]

Indikationen :

- 1. Angina pectoris**
 - a. De novo AP
 - b. Stabile AP
 - c. Stumme Ischämie
 - d. Instabile AP
 - e. AP Rezidiv
 - nach Bypass Operation
 - nach PTCA
- 2. AP Äquivalent**
 - a. Arrhythmien/ erfolgreiche Reanimation nach plötzlichem Herztod
 - b. Dyspnoe
 - c. Synkopen/ Präsynkopen
- 3. Myokardinfarkt**
 - a. Postinfarkt AP
 - b. Primäre PTCA
 - c. Kardiogener Schock
 - d. Positiver Ischämienachweis
 - e. Ventrikuläre Rhythmusstörung nach Myokardinfarkt
- 4. Objektive Ischämiezeichen**
 - a. Ruhe EKG
 - b. Belastung EKG
 - c. 24h EKG
 - d. Stressechokardiographie
 - e. Belastungsszintigraphie
 - f. Positronen Emissions Tomographie

Abb. 3 Klinische Indikationen für die Durchführung einer PTCA (modifiziert nach [4])

1.4 Komplikationen der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie und der Stentimplantation

Akute Komplikationen der PTCA sind mit einer Inzidenz von 4 - 8 % v.a. ein Gefässverschluss, wodurch ein Myokardinfarkt entstehen könnte. Der Verschluss ist in 80 % durch eine Koronardissektion bzw. ein intramurales Hämatom, in 20 % durch eine Thrombose oder durch einen Koronarspasmus bedingt. Das Gefäss kann entweder durch eine sich direkt anschliessende Stentimplantation oder durch eine in weniger als 1 % der Fälle notwendigen, notfallmässigen Bypassoperation wiedereröffnet werden. Stents sind Gefässstützen, die über den Interventionskatheter von innen in die Arterie eingebracht werden, um das Gefäss zu

1. Einleitung

weiten. Ein Stent besteht aus einem feinen, dehnbaren, röhrenförmigen Metallgeflecht, das in die verengte Stelle des Gefäßes eingesetzt wird und dort verbleibt (siehe Abb. 4) [6].

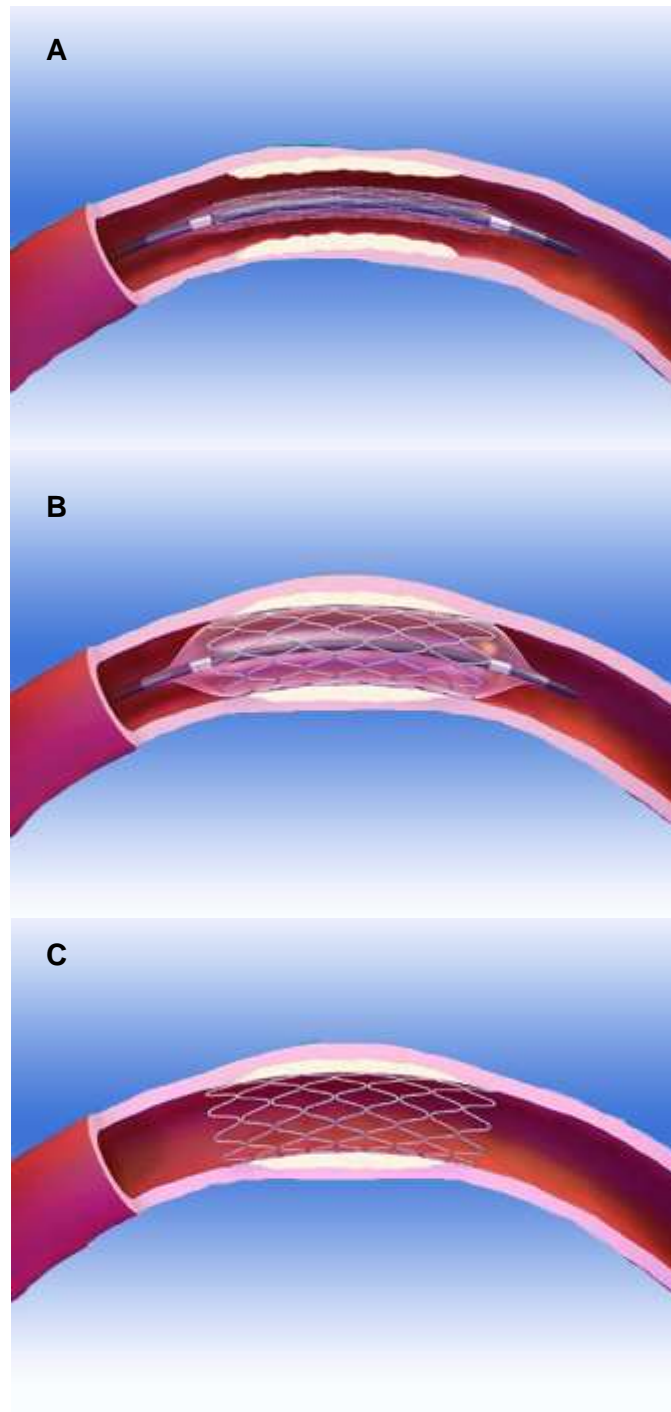


Abb. 4 PTCA und Stentimplantation über einen Interventionskatheter [6]

A. Der Stent ist auf dem Angioplastie-Ballonkatheter befestigt und wird mit diesem an die Lokalisation der Stenose im Gefäß gebracht

B. Der Angioplastieballon wird aufblasen, und hierdurch der Stent in die Innenwand des dilatierten Gefäßes gedrückt

C. Anschliessend wird der Ballon entleert, der expandierte Stent verbleibt an der Arterienwand

1. Einleitung

Die Stentimplantation ist unter diesen Umständen in 95 – 100 % erfolgreich. Eine eher seltene Komplikation ist die Koronarperforation oder – ruptur. Ausserdem kann es während einer PTCA zu Arrhythmien und einer art. Hypotonie kommen. Neben den akuten Komplikationen ist v.a. die Entwicklung einer Restenose des behandelten Gefässes die wichtigste Limitation dieser Revaskularisierungsmethode im Langzeitverlauf. Die Restenoserate lag während der letzten 20 Jahre bei einer Inzidenz von 30 – 50 % der Patienten nach Ballonangioplastie [4]. Mit Hilfe von angiographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Restenose am häufigsten nach 1-3 Monaten und bei 95 % der Patienten während der ersten 6 Monate entwickelt [7, 8]. Durch den Einsatz von Koronarstents konnte die Restenoserate im Vergleich zur konventionellen Angioplastie gesenkt werden [9, 10]. Doch auch der Erfolg des Einsatzes von Stents wird durch das Auftreten einer Restenose limitiert. Trotz aktueller Verbesserungen im Stentdesing und dem Einsatz von Medikamente-freisetzende Stents kommt es immer noch in etwa 10 – 20 % der Interventionen, in Abhängigkeit des jeweiligen Risikoprofils, zu der Entwicklung einer Restenose [11, 12]. Zu den Risikofaktoren zählen klinische, anatomische und eingriffsspezifische Parameter (siehe Abb. 5) [4]. So erhöhen kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie die Wahrscheinlichkeit einer Restenoseentwicklung. Auch die Lokalisation und die Ausprägung der Stenose spielen eine Rolle. Hinzu kommen eingriffsspezifische Parameter, wie eine residuelle Stenose >30 % nach durchgeführter PTCA sowie die Größe des verwendeten Ballons.

Klinische Parameter	Anatomische Parameter	Eingriffsspezifische Parameter
<ul style="list-style-type: none"> • Männer • Nikotinabusus • Diabetes mellitus • Hypercholesterinämie • Dialysepflichtige Niereninsuffizienz • Akute Koronarsyndrome 	<ul style="list-style-type: none"> • Proximale, ostiale Lokalisation der Stenose • RIVA Stenose • Venenbypassgrafts • Totalverschlüsse • Bifurkationsstenose • Präsenz von Kollateralen • Lange Stenosen 	<ul style="list-style-type: none"> • Residuelle Stenose > 30% • Zu klein dimensionierte Ballons

Abb. 5 Risikofaktoren für die Entwicklung einer Restenose [4]

1.5 Pathophysiologie der Restenosierung nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie und nach Stentimplantation

Die Pathophysiologie der Restenoseentstehung ist anhand von Tiermodellen und menschlichen Präparaten gut untersucht. Es kommt bei der PTCA mit oder ohne Stent Implantation durch die Dilatation des Gefäßes zu einer Verletzung der Gefäßwand. Die nachfolgende Reaktion des Körpers auf diese Verletzung, die sofort nach der erfolgten Intervention beginnt und typischerweise nach 3 – 6 Monaten in einer Restenosierung des Gefäßes endet, ist entscheidend für den Langzeiterfolg dieser Methode. Die Restenosierung ist auf der einen Seite durch Schrumpfen des Gefäßdurchmessers aufgrund elastischer Rückstellkräfte und eines fibrotischen Umbau der Adventitia bedingt. Auf der anderen Seite kommt es zu einer sogenannten Neointimabildung, durch v.a. Proliferation und Migration verschiedener Zellarten in der Gefäßwand. Durch beide Mechanismen verkleinert sich das Lumen des Gefäßes erneut. Die Schrumpfung des Gefäßquerschnitts durch elastische und fibrotische Veränderungen konnte durch den Einsatz von Stents behoben werden, die wie ein Gerüst von innen diese Wiederverengung verhindern. Die pathologische, überschüssende Neointimabildung jedoch ist nach einer Stentimplantation im Vergleich mit der konventionellen Ballonangioplastie sogar verstärkt und führt zu einer Restenosierung des Gefäßes. Das Ergebnis dieser pathologischen Reaktion ist auch in dem in Abb. 6 dargestellten restenosierte Gefäß zu erkennen. Die Neointima entwickelt sich in mehreren Stadien, ähnlich einer überschüssenden Wundheilungsreaktion. In einer ersten Phase kommt es zu einer raschen Thrombozytenaggregation an den Stellen, an denen das Gefäß durch die Ballondilatation und Stentimplantation verletzt wird. Innerhalb der ersten 24 Stunden kommt es weiterhin zu einer Akkumulation von Fibrin und Erythrozyten an die aggregierten Thrombozyten. Durch den Einsatz von GP IIb/IIIa Antagonisten, wie z.B. Tirofiban, kann die überschüssende Aggregation von Thrombozyten mit nachfolgendem Gefäßverschluss gut beherrscht werden. In der weiteren Folge kommt es zu einer Anhäufung von Entzündungszellen in der Gefäßwand. Es konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass es zu einer Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren durch verschiedene Zellarten kommt und sich ausserdem Plasmaproteine wie Vitronectin, Osteopontin und Fibronectin an den Stellen der Läsionen anreichern. Auch Zellrezeptoren, im speziellen das $\alpha_v\beta_3$ Integrin, werden in diesem Zusammenhang vermehrt exprimiert [13-16]. Durch die Kombination dieser chemotaktischen und haptotaktischen Stimuli kommt es zu einer Proliferation und Migration hauptsächlich von glatten Gefäßmuskelzellen, welche zu einer Akkumulation dieser Zellen in der Neointima führt. Hierdurch kommt es zu einer

1. Einleitung

Vergrößerung des Volumens der Zellwand mit nachfolgender Stenosierung des Gefäßlumens. Vor allem die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media des Gefässes in Richtung des Gefäßlumens und die Veränderung ihres Phänotyps zu einer Sekretionsform wird für die Wiederverengung der Arterie verantwortlich gemacht [17, 18]. Es konnte gezeigt werden, dass die hierbei entstehende Neointima hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und EZM Proteinen besteht. Das Ergebnis dieser überschüssigen Heilung führt zu der Entstehung einer Restenose, mit einem erneut verminderten Blutfluss. Dies zeigt sich durch ein Wiederauftreten der klinischen Ischämiesymptome, und macht oft eine erneute Intervention notwendig. Dem besseren Verständnis und der Verhinderung dieser pathologischen Neointimabildung mit nachfolgender Restenosierung des behandelten Gefässes kommt, angesichts immer weiter steigender Interventionszahlen, unter medizinischen wie auch unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten eine immense Bedeutung zu.

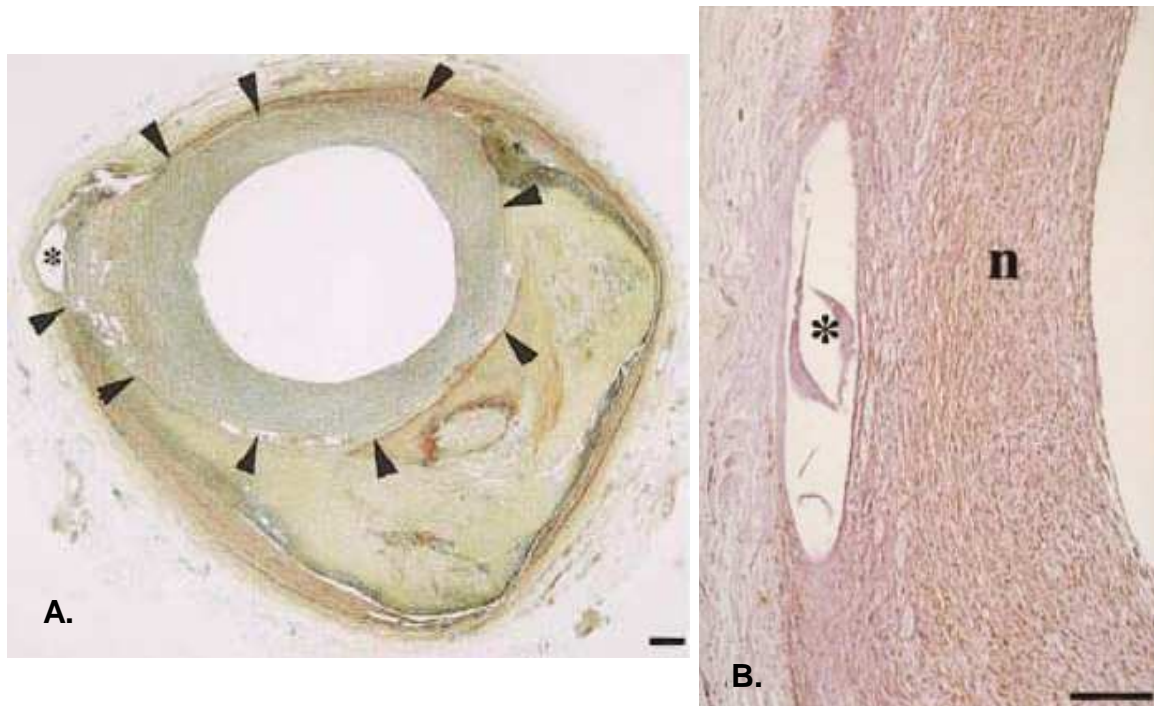


Abb. 6 Restenosierung nach Stentimplantation [modifiziert nach 19]

A. Zu erkennen ist in der Abbildung ein durch Neointimabildung restenosierte Gefäss nach PTCA mit Stentimplantation 10 Monate zuvor. Mit den Pfeilspitzen ist das ursprüngliche Lumen des dilatierten Gefässes zu erkennen. Durch die Neointimabildung ist dieses erneut deutlich reduziert worden. Mit einem Stern ist der implantierte Stent markiert. Man erkennt, dass an dieser Stelle die Neointimabildung noch ausgeprägter ist. Der Grössenbalken entspricht 0,2 mm.

B. Hier ist ein Gefässausschnitt zu erkennen, der mit α Actin gefärbt wurde. Zu erkennen ist, dass die Neointima zu einem grossen Teil aus glatten Muskelzellen besteht. Der Stern markiert den implantierten Stent. Der Grössenbalken entspricht 0,12 mm.

1.6 Verminderung der Restenose durch Medikamente-freisetzende Stents

Um einer Restenoseentwicklung entgegen zu wirken, hat sich hauptsächlich die Verwendung von Medikamente-freisetzenden Stents durchgesetzt. Bei dieser Strategie sollen in einem auf dem Stent aufgebracht Polymer enthaltene Substanzen lokal an dem Ort des pathologischen Geschehens freigesetzt werden und die Entstehung der Neointima verhindern [17, 18]. Aktuell verwendete Medikamente-freisetzende Stents beinhalten immunsuppressive und zytostatische Substanzen, wie z.B. Sirolimus oder Paclitaxel. Hierdurch konnte das Auftreten einer Restenose signifikant reduziert werden [19]. Aber die Restenosierung konnte durch den Einsatz dieser Stents nicht bei allen Patienten verhindert werden, v.a. nicht wenn sie einer Gruppe mit einem erhöhten Restenoserisiko angehörten. Somit wurde bei diesen Patienten oft eine erneute Intervention nötig. Ausserdem hemmen die unspezifischen zytostatischen Effekte dieser Substanzen auch die Migration von Endothelzellen. Dies führt zu einer verzögerten oder unvollständigen Heilung der Läsionen und kann ein erhöhtes Risiko für eine späte Thrombose darstellen [20, 21]. So hat die amerikanische Zulassungsbehörde FDA alle Ärzte im September 2006 aufgefordert, Medikamente-freisetzende Stents nur noch in den zugelassenen Indikationen anzuwenden, da ihr Einsatz ansonsten evtl. sogar eine erhöhte Gefahr für den behandelten Pat. bedeutet. US Experten rechnen vor, dass es durch den Einsatz medikamente-freisetzender Stents ausserhalb strenger Indikationsstellung zu mehr als 2000 Todesfällen pro Jahr komme [22]. Deshalb wäre es wünschenswert eine selektivere Substanz für einen Medikamente-freisetzenden Stent zu verwenden, die eine Restenosierung des Gefässes verhindert, ohne die Nebenwirkungen von unselektiven Wirkstoffen mit sich zu bringen.

1.7 Rolle der Integrinrezeptoren in der Restenoseentstehung

Einen vielversprechenden Ansatz für die Verminderung der Restenose nach PTCA stellt die direkte Inhibition der Migration von glatten Gefässmuskelzellen über Oberflächenrezeptoren dar, die für die Adhäsion und Migration dieser Zellen verantwortlich sind. Im besonderen ist die Gruppe der Integrin Rezeptoren für die Bindung von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix notwendig. Integrine sind heterodimere Glykoproteine der Zellmembran, bestehend aus je einer α - und β - Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Sie haben einen kurzen zytoplasmatischen Fortsatz, der, mit Ausnahme der β_4 Untereinheit, 30 – 50 Aminosäuren lang ist [23]. Intrazellulär binden sie an einen Protein Komplex, der u.a. Talin, Vinculin, Actintin und Filamin enthält [24]. Über sogenannte fokale

Kontakte wird über Integrinrezeptoren eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett der Zelle hergestellt. Diese Kontaktstellen sind u.a. für die Migration von Zellen essentiell und unterliegen einer ständigen dynamischen Umformung. An der Regulation der Protein Komplexe sind u.a. auch verschiedene Proteinkinasen, wie die „focal adhesion kinase“ (FAK), beteiligt [25].

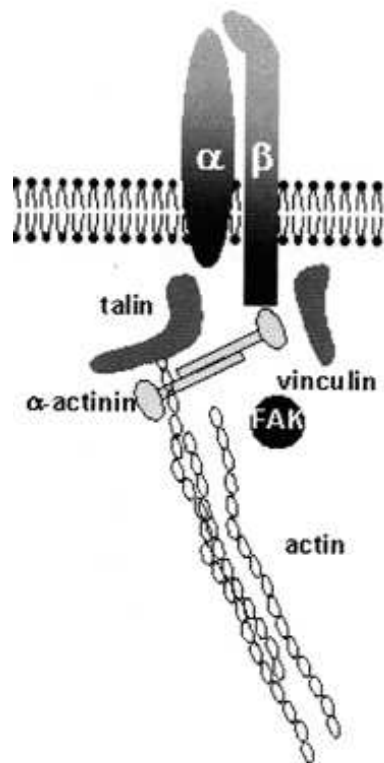


Abb. 7 Integrinrezeptor mit intrazellulären Verbindungen (modifiziert nach [26])

Dargestellt ist ein Integrinrezeptor, bestehend aus einer α - und einer β - Untereinheit in der Zellmembran. Der zytoplasmatische Fortsatz des Rezeptors ist assoziiert mit verschiedenen intrazellulären Proteinen und der Proteinkinase FAK (focal adhesion kinase).

Jede Kombination der α - und β - Untereinheiten hat eine Spezifität für bestimmte Liganden der extrazellulären Matrix [23] und übernimmt auch Aufgaben in der Signaltransduktion. So regulieren Integrinrezeptoren die Aktivität verschiedener zytoplasmatischer Kinasen, von Wachstumsfaktorrezeptoren und Ionenkanälen. Auch die Organisation des intrazellulären Aktinzytoskeletts wird u.a. durch sie gesteuert [27]. Diese Rezeptorfamilie spielt eine bedeutende Rolle u.a. in der Zelladhäsion [28], der Proliferation, der Apoptose [29] und der Zellmigration [30]. Verschiedene Typen aus dieser Gruppe werden auf glatten Gefäßmuskelzellen (GMZ) exprimiert. Während die Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_{2/3}\beta_1$ v.a. der

1. Einleitung

Adhäsion der GMZ an EZM Proteine, wie Fibronectin und Kollagen, dienen, stellen die Dimere $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ Zellrezeptoren für Osteopontin und Vitronectin dar [31]. In Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass v.a. das $\alpha_V\beta_3$ Integrin bei der Entstehung der Neointima mit daraus resultierender Restenosierung im Gewebe vermehrt exprimiert wird. Auch Plasmaproteine wie Vitronectin und Osteopontin reichern sich an den Stellen der durch PTCA verursachten Läsionen an [13-16]. Diese Proteine stellen Liganden des Integrins $\alpha_V\beta_3$ dar [23]. Verschiedene in vivo und in vitro Studien weisen darauf hin, dass die Inhibition dieses Membranproteins mittels Peptiden oder Antikörpern die Wanderung glatter Gefäßmuskelzellen hemmen [32, 33] und die Entstehung einer Restenose im Tiermodell signifikant vermindern kann [31, 34, 35]. Aber keiner dieser Ansätze konnte, aufgrund der Pharmakologie der Substanz oder der Schwierigkeit der Verabreichung, klinisch genutzt werden, um die Restenoseentstehung nach einer PTCA mit Stentimplantation bei Patienten zu verhindern. Der $\alpha_V\beta_3$ Integrinrezeptor stellt somit einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Verhinderung einer Restenosierung dar. Man muss für einen effizienten klinischen Einsatz eine geeignete Substanz auswählen und eine effektive Applikationsmöglichkeit entwickeln.

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll die Basis für die Durchführung eines Tierexperiments geschaffen werden. In Versuchen soll der Einfluss eines von der Firma Merck zur Verfügung gestellten α_v Integrininhibitors (Cilengitide) auf die Signaltransduktion, die Adhäsion und die Migration primärer glatter Gefäßmuskelzellen mit Hilfe von Zellkulturen erforscht werden. Diese Ergebnisse sollen die Grundlage für die Entwicklung eines Medikamente-freisetzenden Stents legen, der mittels der lokalen Freisetzung dieses Inhibitors selektiver und effektiver als die aktuell eingesetzten Produkte eine Restenoseentwicklung nach PTCA mit Stentimplantation verhindern soll. Für die Versuche werden primäre Gefäßmuskelzellen verwendet, die in der Pathophysiologie der Neointimaentwicklung eine bedeutende Rolle einnehmen [36].

Ziele der Doktorarbeit sind:

- ➔ Nachweis der α_v Integrine und Charakterisierung der verwendeten primären glatten Gefäßmuskelzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie
- ➔ Untersuchung der intrazellulär induzierten Signalkaskaden nach Stimulation der α_v Integrine durch Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) und der Veränderungen dieser Signale durch den Einfluss des α_v Integrininhibitors mittels Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzmikroskopie
- ➔ Adhäsionsexperimente auf verschiedenen EZM Proteinen und Beurteilung der Veränderungen durch α_v Integrininhibition
- ➔ Migrationsversuche unter Stimulation durch die EZM Proteine und Untersuchung, ob der verwendete Inhibitor in der Lage ist die Wanderung der GMZ zu hemmen

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Zellart

Die verwendeten primären Gefäßmuskelzellen stammten aus Koronararterien von Schweinen. Sie wurden von der Firma „Cell Applications Inc.“, San Diego, USA bezogen. Die Passagen 3 bis 9 wurden für die Experimente verwendet.

3.1.2 Medien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultivierung

Folgende in der Tabelle aufgeführte Medien und Materialien wurden für die Kultivierung der primären Gefäßmuskelzellen und die Versuche verwendet.

Name	Beschreibung	Firma
DMEM	synthetisches Zellkulturmedium mit L-Glutamin	PAA Lab., Linz, Österreich
SMGM	Wachstumsmedium für glatte Muskelzellen	Cambrex, East Rutherford, USA
FCS	Fötale Kälberserum	PAA Lab., Linz, Österreich
Serumarmes Medium	DMEM mit 0,5 % FCS	PAA Lab., Linz, Österreich
Suspensions- medium	DMEM mit 0,25 % Rinderserumalbumin	PAA Lab., Linz, Österreich
Einfriermedium	DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO	PAA Lab., Linz, Österreich

Tab.1 Übersicht über die für die Zellkulturen verwendeten Medien und Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Antikörper

Die in der Tabelle aufgeführten Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen für die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) bzw. für die Western Blot Analysen (WB) verwendet.

Antikörper	Typ	Name	Herkunft	Konzentration	Firma
Vinkulin (human)	IgG ₁	hVin-1	Maus	1:100 IF	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Myosin (glatter Muskel)	IgG ₁	HSM-V	Maus	1:100 IF	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
α -Aktinin	IgM	BM-75.2	Maus	1:100 IF	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
α -Aktin (glatte Muskelzelle)	IgG _{2a}	1A4	Maus	1:100 IF	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
$\alpha_v\beta_5$ Fluoreszein konjugiert (human)	IgG ₁	P1F6	Maus	1:100 IF	Chemicon, Hampshire, England
$\alpha_v\beta_3$ Fluoreszein konjugiert (human)	IgG ₁	LM609	Maus	1:100 IF	Chemicon, Hampshire, England
FAK monoklonal	IgG ₁	77	Maus	1:100 IF 1:1000 WB	BD Transduction Lab, Heidelberg, Deutschland
FAK polyklonal	poly.		Kaninchen	1:400 IF	D. Schlaepfer, The Scripps Research Institute, USA
pY397 FAK	poly.		Kaninchen	1:1000 WB	Biosource Int. Camarillo, USA
Talin	poly.		Kaninchen	1:200 IF	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

3. Material und Methoden

Antikörper	Typ	Name	Herkunft	Konzentration	Firma
Phosphotyrosin	IgG _{2bκ}	4G10	Maus	1:100 IF 1:1000 WB	Upstate Biotech., Hampshire, England
Phalloidin FITC konjugiert				1:200 IF	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin TRITC konjugiert				1:400 IF	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin Alexa 488 konjugiert				1:200 IF	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Ziege anti Maus Cy 3 konjugiert	IgG		Ziege	1:100 IF	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, England
Ziege anti Maus Cy 2 konjugiert	IgG		Ziege	1:100 IF	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, England
Ziege anti Kaninchen Cy 3 konjugiert	IgG		Ziege	1:100 IF	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, England
Kaninchen anti Maus Peroxidase konjugiert			Kaninchen	1:3000 WB	Dako, Hamburg, Deutschland
Protein A Peroxidase konjugiert			Staph. aureus	1:3000 WB	ICN Biomedicals Irvine, USA

poly. = polyklonaler Antikörper, IF = Verwendung für Immunfluoreszenzfärbungen, WB =
Verwendung für Western Blot Analysen

Tab. 2 Übersicht über die für die Versuche verwendeten Antikörper

3.1.4 Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien für Zellkulturversuche

PBS	0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,1 g MgCl ₂ H ₂ O, 8 g NaCl, 2,16 g Na ₂ PO ₄ 7 H ₂ O, pH 7,4, ad 1 l mit A. bidest (1 x PBS)
PBS ⁺⁺	PBS mit 0,25 mM MgCl ₂ und 0,35 mM CaCl ₂
Ripa Lyse Puffer	Triton x-100 (1 %), Hepes (50 mM) pH 7.4, NaCl (150 mM), Glycerol (10 %), EGTA (1 mM), MgCl ₂ (1.5 mM), Natriumpyrophosphat (10 mM), NaF (100 mM), Deoxycholatsäure (1 %), SDS (0.1 %), Natriumorthovanadat (1 mM), Leupeptin (5 µg/ml), Aprotonin (10 µg/ml) Pefabloc (10 µg/ml), Pepstatin (5 µg/ml), Benzamidin (10 µM)
Triton Puffer	Triton X-100 (1 %), Hepes (50 mM) ph 7.4, NaCl (150 mM), Glycerol (10 %), EGTA (1 mM), MgCl ₂ (1,5 mM), Natriumpyrophosphat (10 mM), NaF (100 mM), Natriumorthovanadat (1 mM), Leupeptin (5 µg/ml), Aprotonin (10 µg/ml) Pefabloc (10 µg/ml), Pepstatin (5 µg/ml), Benzamidin (10 µM)
Blockierlösung	PBS ⁺⁺ mit 10 % Kälberserum und evtl. 0,2 % Saponin (bei den Ansätzen, in welchen die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert wurden)
Natriumboratpuffer	5,03 g di-Natriumtetraborat gelöst in 250 ml A. bidest (0,1 M), pH 9,4
Kristallviolett	250 mg in 5 ml 96 % Ethanol (5 % Lösung)
Fixierungslösung	75 ml 50 % Ethanol mit 25 ml Essigsäure

3. Material und Methoden

Trypsin/EDTA	0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS (PAA Lab., Linz, Österreich)
MEM NEAA	nicht essentielle Aminosäuren (PAA Lab., Linz, Österreich)
Vitronektin	human (Chemicon, Hampshire, England)
Fibronektin	vom Rind (MP Biomedicals, Irvine, USA)
Poly-D-Lysin	(Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
α_v Integrininhibitor	Cilengitide (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.1.5 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western Blot Analysen

Probenpuffer (2 x)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % β -Mercaptoethanol, 5 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 20 % Glycerol
Probenpuffer (4 x)	250 mM TRIS-HCl (ph 6.8), 20 % β -Mercaptoethanol, 10 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol
SDS-PAGE-Standard	5 mg Meerrettich Peroxidase (40 kDa), 5mg Rinderserumalbumin (66 kDa), 5 mg Lipoxidase (96 kDa), 5 mg β -Galaktosidase (116 kDa), 5 mg Myosin aus Kaninchenmuskel (205 kDa) gelöst in 5ml Triton-Puffer und 5ml 2x Probenpuffer
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8

3. Material und Methoden

APS	10 % Ammoniumperoxodisulphat
TEMED	0,1 % N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
SDS	20 % SDS
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Färbelösung	25 % Isopropanol, 10 % Eisessig, 0,03 % Coomassie Brilliant Blue R 250
Entfärbelösung	10 % Isopropanol, 10 % Eisessig
Transferpuffer	6,0 g Tris-Base, 28,8 g Glycin, 430 ml Methanol, 0,1 % SDS, ad 2 l mit A. bidest
TBS	25 mM Tris (pH 7,5), 125 mM NaCl
TBS-T	25 mM Tris (pH 7,5), 125 mM NaCl, 0,1 % Tween-20
Blocklösung	2 % BSA in TBST, 0,05 % NaN ₃
ECL	0,225 mM p-Coumaratsäure, 1,25 mM Luminol, 0,1 M Tris-Base pH 8,5
H ₂ O ₂ -Lösung	30 % Wasserstoffperoxid
“Stripping”-Puffer	0,8 % SDS, 0,8 % β-Mercaptoethanol, 80 mM Tris-HCl pH 6,8

3.1.6 Chemikalien und Kits

Acrylamid (Roth GmbH, Karlsruhe), Ammoniumsulfat (Roth GmbH, Karlsruhe), Antibiotika (Roth GmbH, Karlsruhe), APS (Roth GmbH, Karlsruhe), BSA (Roth GmbH, Karlsruhe), Chemiglow (Alphainnotech, San Leandro, USA), Glycerin (Roth

GmbH, Karlsruhe), Glycin (Sigma Aldrich, Deisenhofen), mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland), Paraformaldehyd (Roth GmbH, Karlsruhe), Protein A/G Agarosebeads (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), Saponin (Roth GmbH, Karlsruhe), TEMED (Roth GmbH, Karlsruhe), Tris-Base (Roth GmbH, Karlsruhe), Triton-X-100 (Roth GmbH, Karlsruhe), Trypton (Roth GmbH, Karlsruhe), Tween-20 (Roth GmbH, Karlsruhe), β -Mercaptoethanol (Roth GmbH, Karlsruhe)

3.1.7 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav (Varioklav, Thermo Electron GmbH, Oberschleissheim, Deutschland), Deckgläschen/Objektträger (Knittel, Braunschweig, Deutschland), Eismaschine (Scotsman, Vernon Hills, USA), Elektroblob-Apparatur (Bio Rad, München, Deutschland; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), Entwickler (Agfa, Köln, Deutschland), Filmkassette (Rego, Augsburg, Deutschland), FPLC (Bio Rad, München, Deutschland), Gelapparatur für Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio Rad, München, Deutschland), Geldokumentation (Bio Rad, München, Deutschland), Glaswaren (Schott, Mainz, Deutschland; VWR Brand, Wien, Österreich), Heizblöcke (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland; Grant Boekel, Cambridgeshire, England), Inkubatoren (Heraeus, Hanau, Deutschland), Konfokales Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), Kühl- und Gefrierschränke (Privileg, Fürth, Deutschland), Magnetrührer (Ika, Staufen, Deutschland), pH-Meter (Beckman, Krefeld, Deutschland), Phasenkontrastmikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland), Photometer (Hach, Düsseldorf, Deutschland), Pipetten (Gilson, Middleton, USA), Pipettierhilfe (Brand, Wertheim, Deutschland), Plastikwaren (Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Greiner, Frickenhausen, Deutschland; Vitaris, Baar, Schweiz), PVDF-Membranen (Millipore, Schwalbach, Deutschland), Röntgenfilme Retina (Dunker, Hattingen, Deutschland), Schüttler (Bühler, Hechingen, Deutschland), Schwenker (Heidolph, Schwabach, Deutschland), Spannungsgeräte (Bio Rad, München, Deutschland), Sterilbank (Heraeus, Hanau, Deutschland), Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Tieftemperaturgefäße Nalgene (Nalge Nunc International, Rochester, USA), Vortexer (Ika, Staufen, Deutschland), Waagen (Kern, Balingen-Frommern, Deutschland; Scaltec, Göttingen, Deutschland), Wasserbäder (Memmert, Schwabach, Deutschland; Julabo,

3. Material und Methoden

Seelbach, Deutschland), Zählkammer Neubauer (Brand, Wertheim, Deutschland), Zentrifugen (Heraeus, Hanau, Deutschland; Sorvall, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Kultiviert wurden die Zellen mit „smooth muscle cell growth medium“ bzw. mit DMEM, dem 10% fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und nicht essentielle Aminosäuren zugesetzt wurden bei 37°C und 5 % CO₂. Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Zum Splitten wurden die Zellen zunächst zweimal mit einer Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen, dann mit 3 ml 0,025 % Trypsin/EDTA für ca. 3 min von den Zellkulturplatten abgelöst und die Trypsinierung anschliessend mit 3 ml des serumhaltigen Kulturmediums abgestoppt. Anschliessend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugationsröhrchen übernommen und bei 600 U/min für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde danach in frischem Kulturmedium aufgenommen. Meist wurden die Zellen 1:3 auf mit 0,1 % Gelatine über Nacht bei 4°C beschichtete Zellkulturschalen gesplittet. Für die Experimente wurden die Zellen von Passage 3 bis 9 verwendet.

Für die meisten Experimente wurden die Zellen über Nacht mit einem serumarmen Medium (DMEM mit 0,5 % fötales Kälberserum) inkubiert. Als Suspensionsmedium wurde DMEM mit 0,25 % Rinderserumalbumin verwendet. Bei den Experimenten wurden zum Abstoppen der Trypsinierung 3 ml eines 0,25 % Soja Trypsin Inhibitor verdünnt in Suspensions Medium verwendet, um eine Stimulation der GMZ durch Serumproteine zu vermeiden.

3.2.2 Einfrieren der primären Gefässmuskelzellen

Um die primären glatten Muskelzellen einzufrieren, um sie für spätere Experimente zu konservieren, wurden die Zellkulturschalen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen mit 3 ml 0,025 % Trypsin/EDTA von den Platten abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit 3 ml des serumhaltigen Kulturmediums abgestoppt. Dann wurden sie für 5 Minuten bei 600 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in auf 4°C gekühltes Einfriermedium (DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen. DMSO dient als Schutzmittel. Es verhindert eine

Zerstörung der Zellmembran durch Hemmung der Kristallisation des intrazellulären Wassers. Eine Zellkulturschale wurde in 1 ml Medium aufgenommen und in Tieftemperaturgefäße transferiert. Um einen schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80°C in einer Styroporbox gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in die Gasphase von flüssigem Stickstoff (-180°C) gebracht, wo sie dann dauerhaft gelagert wurden.

3.2.3 Auftauen der primären Gefäßmuskelzellen

Ein schneller Auftauvorgang ist für das Überleben der Zellen entscheidend. Der Kontakt der Zellen zu DMSO sollte während des Auftauvorgangs möglichst kurz gehalten werden, da es für die Zellen toxisch ist. Deshalb wurden die gefrorenen Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell erwärmt. Sobald die GMZ in Suspension vorlagen, wurde diese in 9 ml Zellkulturmedium übernommen und bei 600 U/min für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde anschliessend in 10 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen und auf eine über Nacht mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturschale ausgebracht. Kultiviert wurden die primären Gefäßmuskelzellen bei 37°C und 5 % CO_2 .

3.2.4 Bestimmung der in einer Suspension enthaltenen Zellanzahl

Die Anzahl der in der Zellsuspension enthaltenen Zellen wurde mit Hilfe einer „Neubauer improved“ Zählkammer (Marienfeld) bestimmt. Hierzu wurden etwa $15\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Anschliessend wurden jeweils 16 in der Kammer vorgegebene Quadrate in den vier Ecken der Kammer ausgezählt. Die so ermittelte Zahl musste durch 4 dividiert werden, um die Zellzahl pro Milliliter Suspension zu bestimmen. Um die Gesamtanzahl der in der Suspension enthaltenen Primärzellen zu errechnen, musste dieser Wert mit dem Volumen der Zelllösung multipliziert werden.

Formel zum Errechnen der Zellzahl :

Gezählte Zellzahl : $4 \times \text{Volumen der Zellsuspension (ml)} = \text{Zellgesamtzahl} \times 10^4$

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 2×10^4 Zellen auf ein über Nacht mit einem Protein bzw. mit 0,1 % Gelatine beschichtetes Deckglaschen ausgebracht, auf welchen die Zellen adhärten. Für die meisten Färbungen wurden die Primärzellen über Nacht mit Zellkulturmedium inkubiert. Bei einigen Färbungen wurde zu den kultivierten Zellen der α_v Integrininhibitor verdünnt in serumhaltigem Zellkulturmedium hinzugefügt und die Gefässmuskelzellen nach 45 min fixiert.

Für einige Experimente wurden die Gefässmuskelzellen, wie bei den „Replating“ Versuchen beschrieben, über Nacht mit einem serumarmen Medium (DMEM mit 0,5 % fötalem Kälberserum) inkubiert und mit 0,025 % Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit Soja Trypsin Inhibitor abgestoppt. Anschliessend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 600 U/min abzentrifugiert und das Zellpellet in Suspensionsmedium (DMEM mit 0,25 % Rinderserumalbumin) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C in einem Wasserbad unter regelmässigem Schwenken belassen. Bei den Färbungen mit Cilengitide wurde der α_v Integrininhibitor in den angegebenen Konzentrationen nach 45 Minuten den Zellsuspensionen im Wasserbad zugesetzt und die letzten 15 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert. Alle fünf Minuten wurden die Zellen geschwenkt um einem Verklumpen der Zellsuspension vorzubeugen. Dann wurden 2×10^4 Zellen auf die mit verschiedenen Proteinen beschichteten Deckglaschen ausgebracht und auf denen sie für 45 min die Möglichkeit hatten zu adhärten.

Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur bzw. mit Aceton für 10 min auf Eis fixiert. Anschliessend wurden die Zellen dreimal mit PBS, das 0,25 mM MgCl_2 und 0,35 mM CaCl_2 enthielt (PBS^{++}), gewaschen. Dann wurde für 5 min bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung (PBS^{++} mit 10 % Serum) inkubiert. Bei denen mit Paraformaldehyd fixierten Zellen enthielt die Blockierlösung zusätzlich 0,2 % Saponin um die Zellmembran zu permeabilisieren. Mit den in der Blockierlösung verdünnten primären Antikörper wurden die Zellen für eine Stunde in den in Tab. 2 (siehe Punkt 3.1.3) genannten Konzentrationen bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Anwendung der bereits Fluoreszein konjugierten Integrinantikörper wurde die Inkubation lichtgeschützt durchgeführt. Anschliessend wurde dreimal mit PBS^{++}

gewaschen, erneut blockiert und mit den entsprechenden sekundären Antikörper unter lichtgeschützten Bedingungen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erneut dreifach mit PBS⁺⁺ gewaschen. Auf die Deckgläschen mit den behandelten Zellen wurde dann ein Tropfen „DAKO Fluorescent Mounting Medium“ gegeben. Schliesslich wurden die Deckgläschen kopfüber auf einem Objektträger (Knittel) gelegt und mit Nagellack an den Rändern versiegelt. Die Lagerung der Präparate fand lichtgeschützt bei 4 °C statt. Die GMZ konnten dann mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht werden.

3.2.6 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem Lasermikroskop Axiovert 100M der Firma Zeiss durchgeführt. Das Mikroskop war sowohl mit einem Argon- (Wellenlänge 458 nm, 488 nm, 514 nm) als auch einem Helium/Neonlaser (Wellenlänge 543 nm) ausgestattet. Es wurde ein 40 x Immersionsölobjektiv (Plan Neofluar 40x/1.3 Oil, Zeiss) verwendet. Das Mikroskop wurde über die Software Zeiss LSM 510 (Version 2.5 SP2) gesteuert und die Rohdaten wurden mit Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet. Mit Hilfe der Steuerungssoftware wurden geeignete Einstellungen gewählt, um die Farbstoffe mit den passenden Wellenlängen anzuregen und das emittierte Signal (siehe Tab. 3) über verschiedene Filter selektiv zu detektieren. Die empfangenen Signale wurden verschiedenen Farben zugeordnet, sogenannten Falschfarben. Es wurden Rot für Rhodamin und Cy3 bzw. Grün für Cy 2, Alexa 488 und Fluoreszein (FITC) gewählt. Bei Doppelfärbungen wurden die verschiedenen Farbstoffsignale nacheinander mit dem Mikroskop gescannt. Durch eine Überlagerung der Signale bei einer Kolo-kalisation der mit Antikörpern markierten Proteine ergab sich die Mischfarbe gelb.

Farbstoffname	Anregung (nm)	Emission (nm)	Falschfarbe
Cy 2	489	506	Grün
Fluoreszein (FITC)	495	525	Grün
Alexa 488	495	518	Grün
Cy 3	552	568-574	Rot
Rhodamin (TRITC)	552	570	Rot

Tab. 3 Übersicht über die bei der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Farbstoffe

3.2.7 Signaltransduktions Versuche

Für die „Replating“ Versuche, mit deren Hilfe die intrazellulär induzierten Signale nach Stimulation der GMZ durch Adhäsion auf den verschiedenen EZM Proteinen untersucht wurden, hat man die Zellen über Nacht mit serumarmen Medium (DMEM mit 0,5 % fötalem Kälberserum) inkubiert. Hierdurch wurden die intrazellulären Signalkaskaden durch die fehlende Stimulation durch Serumbestandteile auf ein Basisniveau reduziert. Die Zellkulturschalen für die Versuche wurden über Nacht bei 4° C, mit den verschiedenen in PBS verdünnten Proteinen in den angegebenen Konzentrationen, beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0,025 % Trypsin/EDTA von den Kulturschalen, auf denen sie kultiviert worden waren, abgelöst. Die Trypsinierung wurde bei diesen Versuchen mit einem Soja Trypsin Inhibitor abgestoppt, um eine Stimulation der Zellen durch Serumproteine zu vermeiden. Anschliessend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 600 U/min zentrifugiert und das Zellpellet, nach Absaugen des Überstands, in Suspensionsmedium (DMEM mit 0,25 % Rinderserumalbumin) aufgenommen. Die primären Gefässmuskelzellen wurden dann für eine Stunde bei 37° C in einem Wasserbad inkubiert. Alle fünf Minuten wurden die Zellen geschwenkt um einem Verklumpen der Zellsuspension vorzubeugen. Anschliessend wurde jeweils die gleiche Zellmenge auf die verschiedenen, mit Fibronectin, Kollagen oder Vitronectin beschichteten, Zellkulturschalen ausgebracht. Bei den Versuchen mit Verwendung von Cilengitide (α_v Integrininhibitor) wurde der Hemmstoff in den angegebenen Konzentrationen nach 45 Minuten den Zellsuspensionen im Wasserbad zugegeben und die letzten 15 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert. Die Zellen wurden ausplattiert und für eine Stunde bei 37° C und 5 % CO₂ belassen. Hiernach wurden Zellen entweder mit Aceton für 10 Minuten auf Eis fixiert, um sie anschliessend für Immunfluoreszenzfärbungen zu verwenden, oder die Zellen wurden lysiert, um die Ganzzelllysate mittels Western Blot Untersuchungen zu analysieren oder für eine Immunpräzipitation einzusetzen.

3.2.8 Zellysate

Nach der Adhäsion auf den beschichteten Zellkulturschalen wurden die Zellen für die Western Blot Analysen bzw. die Immunpräzipitation mit einem sogenannten „Cell Scraper“ von den Zellkulturschalen abgelöst, während sie mit Ripa Lyse Puffer lysiert wurden. Dieser Puffer enthält verschiedene Proteinase Inhibitoren um eine Proteindegradation in den gewonnenen Zellysaten durch endogene Enzyme zu verhindern. Anschliessend wurden die Proben für 5 min bei 4° C mit Agarose Beads inkubiert und zweimal für 15 min bei 4° C mit 13000 U/min zentrifugiert, um Zell- und Membranbestandteile zu sedimentieren. Die Überstände mit den darin enthaltenen Proteinen wurden für die Analysen übernommen und das Sediment verworfen. Den Proben wurden jeweils gleiche Mengen eines 2 x bzw. 4 x Proben Puffers hinzugesetzt. Anschliessend wurden die Proben aufgeköcht und nochmals mit einem Schnelldurchlauf zentrifugiert. Mittels SDS – Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) wurden die Proteine der Grösse nach aufgetrennt und mit Western Blot Untersuchungen analysiert.

3.2.9 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellysate mit Triton Puffer etwa 1:1 verdünnt. Die FAK – IP wurde mit einem polyklonalen anti – FAK Antikörper durchgeführt. Diesen Antikörper erhielten wir freundlicherweise von David Schlaepfer vom „Scripps Research Institute“ in La Jolla, Kalifornien. Die Proben wurden für vier Stunden bei 4° C mit dem Antikörper inkubiert. Anschliessend wurden den Zellysaten Protein A/G Agarosebeads hinzugegeben und die Proben wurden erneut für eine Stunde bei 4° C in einer Rotationsmaschine, in der sie kontinuierlich gemischt wurden, belassen. Hiernach wurden die verschiedenen Ansätze mit einem Schnelldurchlauf abzentrifugiert und, nach Absaugen des Überstands, die Pellets zweimal mit 400 µl Triton Puffer gewaschen. Der Überstand wurde anschliessend bis auf etwa 30 µl abgesaugt und den Ansätzen jeweils gleiche Mengen eines 4x Proben Puffers zugesetzt. Dann wurden die Immunpräzipitate aufgeköcht, ein letztes Mal kurz abzentrifugiert und mittels SDS – PAGE und Western Blot Untersuchungen analysiert.

3.2.10 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gewonnenen Ganzzelllysate wurden mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der Grösse nach aufgetrennt. Als Grössenmarker dienten folgende Proteine :

Protein	Grösse
Meerrettich Peroxidase	40 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Lipoxidase	96 kDa
β - Galaktosidase E. coli	116 kDa
Myosin (aus Kaninchenmuskel)	205 kDa

Tab. 4 Übersicht über die als Grössenmarker verwendeten Proteine

Es wurden 7 % bzw. 8 % Polyacrylamidgele als Trenngele verwendet. Die Sammelgele enthielten 5 % Acrylamid.

Die verschiedenen Gele wurden, wie in der Tabelle dargestellt, hergestellt:

Trenngel	Acrylamid/ Bis-Lösung (40 %)	Wasser	1,5 M Tris pH 8,8	20 % SDS	10 % APS	TEMED
7 %	1,75 ml	5,75 ml	2,5 ml	50 μ l	30 μ l	15 μ l
8 %	2 ml	5,5 ml	5 ml	50 μ l	30 μ l	15 μ l
Sammelgel	Acrylamid/ Bis-Lösung (40 %)	Wasser	0,5 M Tris pH 6,8	20 % SDS	10 % APS	TEMED
5 %	1,25 ml	6,15 ml	2,5 ml	50 μ l	30 μ l	15 μ l

Tab. 5 Übersicht über die bei der Herstellung der Polyacrylamidgele verschiedener Konzentration verwendeten Stoffmengen

Die einzelnen Inhaltsstoffe wurden wie in der Tabelle von links nach rechts dargestellt zusammengefügt. Nach dem Schritt, bei dem der Tris Puffer verwendet wurde, wurde die Gellösung für einige Minuten entgast, um einer Blasenbildung in den Gelen vorzubeugen. Die Trenngele polymerisierten für 60 min, die Sammelgele für 30 min. In den Sammelgelen wurden mit einem passenden Kamm 10 bzw. 15 Taschen geschaffen. In die Taschen wurden nach der Polymerisation der Gele und dem Aufbau der PAGE Apparatur die Proben geladen. Bei einer Spannung von 100 V liefen die Gele ca. 1,5 – 2 h. Wenn der im Proben Puffer enthaltene Farbstoff am Unterrand des Gels herausgelaufen war, wurde die SDS – Page gestoppt.

3.2.11 Western Blot Analysen

Die in den Gelen enthaltenen, der Grösse nach aufgetrennten Proteine wurden über Nacht bei einer Spannung von 30 V auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen mit einer hierfür geeigneten Apparatur übertragen („geblottet“).

Die geblottete Membran wurde mit einer Coomassie haltigen Lösung zum Nachweis der Proteinbanden angefärbt und anschliessend nach Markierung der Markerproteinbanden wieder entfärbt. Mit einer Albumin - haltigen Lösung wurden die Membranen für drei Stunden bei Raumtemperatur blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern.

Die auf der Membran gebundenen Proteinbanden wurden mit Hilfe von Antikörpern untersucht. Die für die Western Blot Analysen eingesetzten primären Antikörper wurden in einer 1 : 1000 Verdünnung (verdünnt in der Blockierlösung) verwendet. Die primären Antikörper wurden über Nacht bei 4° C mit den Membranen inkubiert. Zur Detektion der an die Membran gebundenen primären polyklonalen Kaninchenantikörper wurde Peroxidase konjugiertes Protein A eingesetzt. Die monoklonalen Mausantikörper wurden mit einem Peroxidase konjugiertem „Kaninchen anti Maus“ Antikörper markiert. Beide sekundären Antikörper wurden 1 : 3000 in einer Tris gepufferten Salzlösung mit 0,05 % Tween (TBS – T) verdünnt verwendet. Sowohl nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, wie auch mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen dreimal mit der TBS – T Lösung gewaschen. Zur Visualisierung der an die Membran gebundenen Antikörper wurde das Chemiglow™

Reagenzkit benutzt. Das durch eine Enzymreaktion entstandene Lichtsignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert, welcher in einem Agfa Curix 60 anschliessend entwickelt und fixiert wurde.

3.2.12 Adhäsions Versuche

Die Zellen wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium (DMEM mit 0,5 % fötalem Kälberserum) inkubiert. Für die Untersuchungen über die Adhäsion der GMZ wurde eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen („96 well Platte“) mit den verschiedenen, in PBS verdünnten, Proteinen in den angegebenen Konzentrationen über Nacht bei 4° C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0,025 % Trypsin/EDTA von den Kulturplatten, auf denen sie kultiviert wurden, abgelöst. Die Trypsinierung wurde wie bei den „Replating“ Versuchen mit Soja Trypsin Inhibitor abgestoppt. Anschliessend wurden die GMZ für 5 Minuten bei 600 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschliessend das Zellpellet in Suspensions Medium (DMEM mit 0,25 % Albumin) aufgenommen und die Zellen in Suspension gehalten. Die Zellen wurden auch bei diesen Experimenten für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad belassen. Bei den Experimenten mit Cilengitide wurde der Inhibitor wie bei den anderen Versuchen nach 45 min den Zellsuspensionen zugefügt und die Zellen für weitere 15 min mit Inhibitor in Suspension gehalten. Alle fünf Minuten wurden die Zellen geschwenkt um einem Verklumpen der Zellsuspension vorzubeugen. Die Vertiefungen der „96 well Platte“ wurden vor Beginn des Experiments für drei Stunden bei 37°C mit dem Suspensions Medium blockiert. Anschliessend wurden 1×10^4 GMZ pro Vertiefung ausgebracht und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die „96 well“ Platte über Kopf gestürzt, zweimal mit PBS gewaschen und erneut gestürzt. So wurden die noch nicht an den Untergrund gebundenen Zellen entfernt. Die adhärenierten Zellen wurden für 15 min mit einer hierfür geeigneten Lösung (H₂O dest., 37,5% Ethanol, 25 % Essigsäure) fixiert und für 20 min mit Kristall Violett (0,05 %) gefärbt. Schliesslich wurde die Anzahl der adhärenierten GMZ im Mikroskop bei 100 x Vergrösserung ausgezählt. Es wurden 5 Felder pro Vertiefung und jeweils 3 Vertiefungen pro Ansatz ausgezählt. In den Grafiken sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

3.2.13 Migrations Versuche

Für die Migrationsexperimente wurden die Zellen über Nacht mit einem serumarmen Medium (DMEM mit 0,5 % fötalem Kälberserum) inkubiert und am nächsten Tag mit 0,025 % Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst. Abgestoppt wurde die Trypsinierung bei diesen Experimenten mit Soja Trypsin Inhibitor. Anschliessend wurden die GMZ für 5 Minuten bei 600 U/min abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Suspensions Medium (DMEM mit 0,25 % Albumin) aufgenommen. Für diese Versuche wurden sogenannte modifizierten Boyden Migrationskammern (Millicell, 12 mm Durchmesser, 8 µm Poren, siehe Abb. 8) verwendet, die auf der Membranunterseite, mit in DMEM verdünnten Proteinen verschiedener Konzentration, bei Raumtemperatur für zwei Stunden beschichtet wurden. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Kammern mit Suspensionsmedium beschichtet wurden, dem kein Protein hinzugefügt wurde. Anschliessend wurden die Migrationskammern mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen und getrocknet.

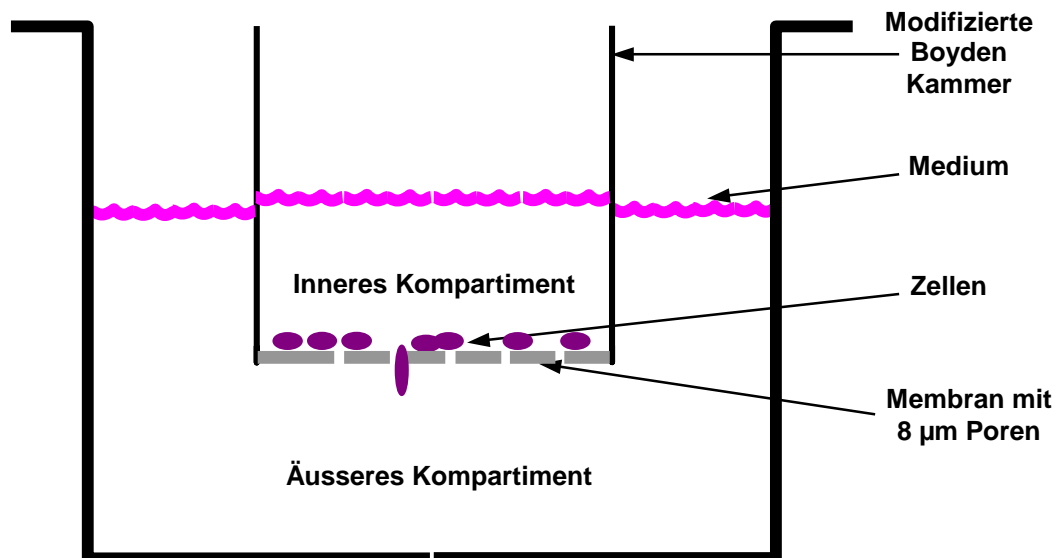


Abb. 8 Versuchsaufbau der Migrationsexperimente

Das innere Kompartiment der Migrationskammern wurde mit 300 µl der Zellsuspension, die 1×10^5 Zellen enthielt, das äussere mit 400 µl Suspensions-Medium

3. Material und Methoden

ohne Gefässmuskelzellen gefüllt. Die verschiedenen Ansätze wurden bei 37°C inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, durch die Membranporen auf die Kammerunterseite zu wandern. Gestoppt wurde der Versuch nach 24 Stunden. Die in der inneren Kammer zurückgebliebenen Zellen wurden mit einem Wattestäbchen entfernt, die auf die Kammerunterseite migrierten Zellen für 15 min mit Methanol fixiert und anschliessend für 20 min mit Kristallviolett (0,05 % verdünnt in Ethanol) gefärbt. Die Anzahl der gewanderten primären Gefässmuskelzellen wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops durch Auszählen bei 200 x Vergrößerung von fünf Feldern pro Migrationskammer für zwei Kammern pro Ansatz bestimmt. In den Grafiken sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt.

Bei den Versuche bei denen der Integrininhibitor eingesetzt wurde, ist dieser sowohl der Zellsuspension im inneren Kompartiment, als auch dem Suspensionsmedium im äusseren Kompartiment in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt worden.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der primären glatten Gefäßmuskelzellen

4.1.1 Nachweis des Proteins „SMC Actin“

Um zu überprüfen, dass es sich bei den kommerziell erworbenen Zellen um primäre glatte Gefäßmuskelzellen handelt, wurden die Zellen anhand von Immunfluoreszenzfärbungen phänotypisch charakterisiert. Untersucht wurde die Expression von „SMC Actin“, einem Aktin Isotyp, der in GMZ vorliegt. Als Negativkontrolle diente die gleichzeitige Anfärbung von Maus Fibroblasten die diesen Aktin Isotyp nicht enthalten.

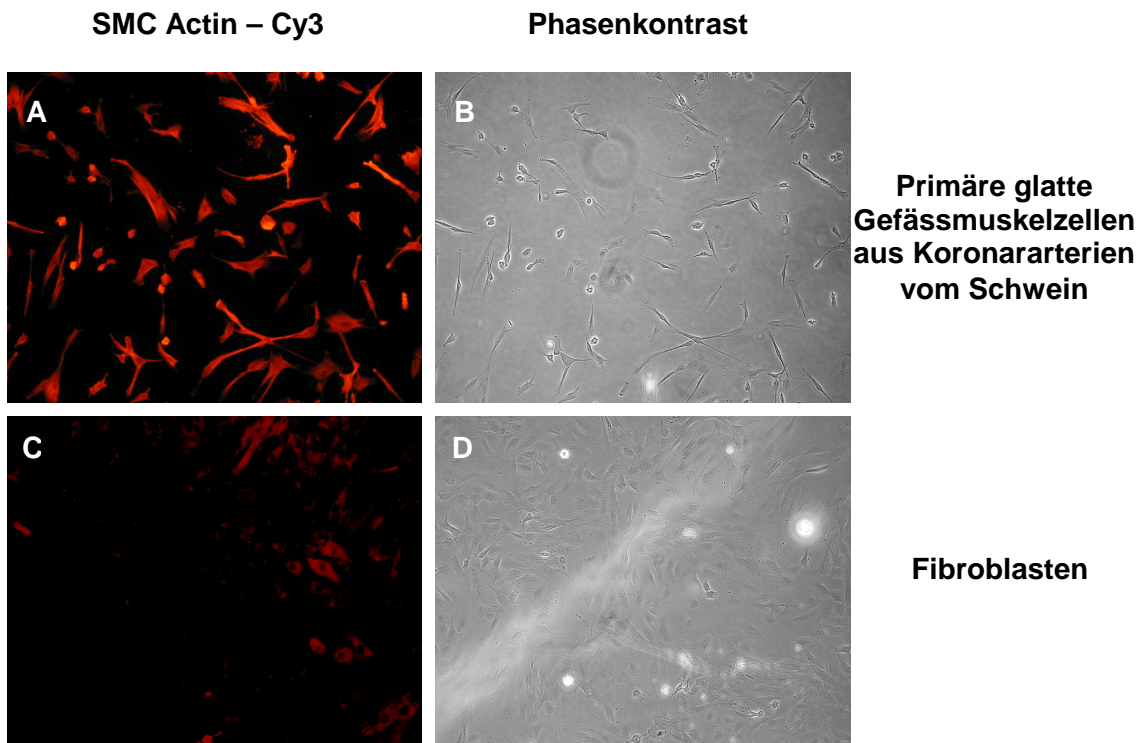


Abb. 9: Nachweis von SMC Actin in den primären GMZ

Die primären glatten Gefäßmuskelzellen (A+B) und die Fibroblasten (C+D) wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen kultiviert, nach 24 h mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembran mit Saponin permeabilisiert. Es folgte die Inkubation mit einem monoklonalen „SMC Actin“ Antikörper, welcher mit einem sekundären Cy 3 markierten Antikörper detektiert wurde. Die linken Bilder (A+C) zeigen die Fluoreszenz-, die rechten Darstellungen die Phasenkontrastaufnahmen (B+D) bei Durchlicht.

4. Ergebnisse

In der Abbildung ist die Expression von „SMC Actin“ in den Bildern der linken Spalte rot (Abb. 9 A + C) dargestellt. Die oberen Bilder (Abb. 9 A + B) zeigen die Untersuchungen an den primären glatten Gefäßmuskelzellen, die unteren Bilder (Abb. 9 C + D) an Maus Fibroblasten. Ein Vergleich des im Cy 3 Kanal erhaltenen Bildes (Abb. 9 A) mit dem Phasenkontrastbild (Abb. 9 B) zeigt, dass annähernd jede GMZ „SMC Actin“ stark exprimiert. In der Kontrolle ist nur eine schemenhafte Färbung (Abb. 9 C) weniger Fibroblasten erkennbar, obwohl sehr viele Zellen vorhanden sind (Abb. 9 D).

4.1.2 Expression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf den für die Experimente eingesetzten Primärzellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren stellen den zellulären Angriffspunkt des verwendeten α_v Inhibitors (Cilengitide) dar und die Expression ist somit für die Wirkung Voraussetzung. Laut den Firmenangaben stammten diese Zellen aus Koronargefässen von Schweinen. Ein Expressionsmuster der Integrinrezeptoren ist für diese Zellart in der Literatur nicht beschrieben.

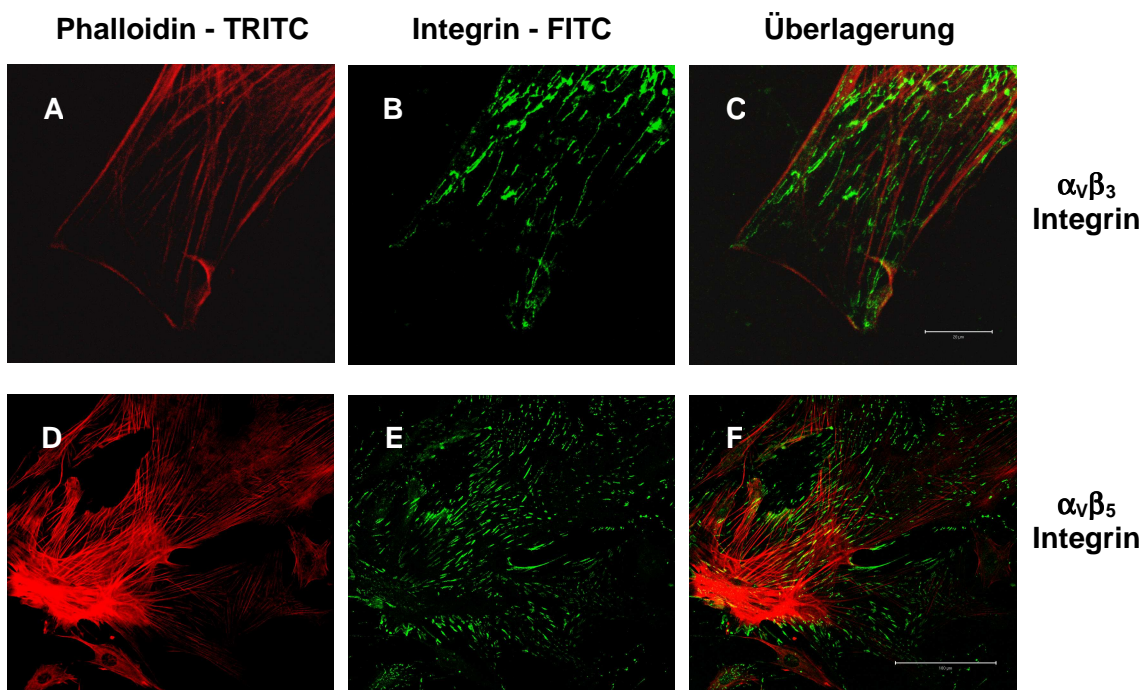


Abb. 10 Expression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$

Die glatten Gefässmuskelzellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach 24 h mit Aceton fixiert. Anschliessend wurden sie mit einem monoklonalen $\alpha_v\beta_3$ – (A-C) bzw. $\alpha_v\beta_5$ – Integrinantikörper (D-F) behandelt. Diese Antikörper waren mit dem Farbstoff FITC markiert, welcher in den Abbildungen grün dargestellt ist (B,C,E,F). Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin, das mit TRITC konjugiert war und in den Bildern rot erscheint, dargestellt (A,C,D,F). In der Überlagerung (C+F) der beiden Farbstoffsignale sind die Aktinfasern (rot) und die Integrinrezeptoren (grün) zu erkennen. Der Grössenbalken entspricht 20 μm in den oberen (A-C) bzw. 100 μm in den unteren (D-F) Bildern.

4. Ergebnisse

In den Abbildungen ist eine simultane Färbung der GMZ mit zwei Farbstoffen dargestellt. Einerseits wurde das Aktinzytoskelett mit Hilfe von Phalloidin-TRITC, hier rot, andererseits die Integrinrezeptoren $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern, hier grün, visualisiert. In den oberen Abbildungen (Abb. 10 A – C) sehen wir einen Ausschnitt aus einer etwa 40 μm breiten Zelle. Man erkennt die Anordnung des Aktins in sogenannten Stressfasern. Ausserdem wird die Assoziation des Zytoskeletts mit den Rezeptoren deutlich. In den unteren Darstellungen sind analog hierzu die Aktinstressfasern (rot) und die $\alpha_v\beta_5$ Integrine (grün) zu sehen. Hier ist ein grösserer Abschnitt mit Anschnitten von mehreren Zellen dargestellt. Auch hier ist die Assoziation des Aktinzytoskeletts mit den Integrinen zu erkennen. Die Integrinrezeptoren sind in der Peripherie der Zellen lokalisiert und liegen an den Enden der Aktinfasern.

4.1.3 Weitere Charakterisierung der Gefäßmuskelzellen durch Immunfluoreszenzfärbungen

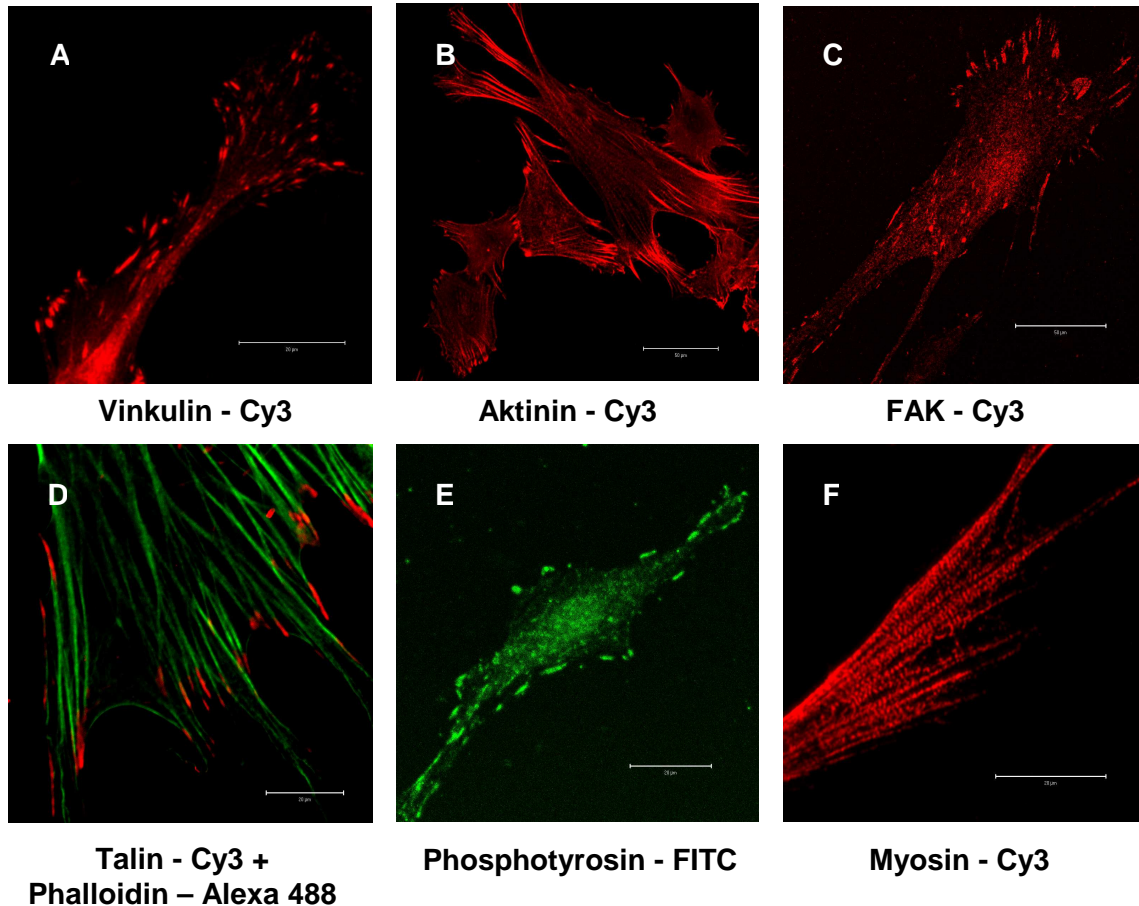


Abb. 11 Immunfluoreszenzfärbungen zur weiteren Charakterisierung der GMZ
Die GMZ wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach 24 h entweder mit Aceton (D) oder mit Paraformaldehyd (A,B,C,E,F) fixiert. Bei den mit PFA fixierten Ansätzen folgte eine Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin. Es wurden verschiedene Proteine mit Hilfe von Antikörpern markiert (A,B,C,D,F), die in einem zweiten Schritt mit einem sekundären Cy 3 konjugierten Antikörper, hier rot dargestellt, detektiert wurden. In Abb. 11 D ist eine Doppelfärbung zu sehen. Neben Talin, das mit Cy 3 markiert wurde und rot erscheint, ist auch das Aktinzytoskelett mit Hilfe von Phalloidin-Alexa 488 markiert worden und in grün zu erkennen. In Abb. 11 E wurde ein Phosphotyrosin Antikörper verwendet, der mit einem Cy 2 markierten sekundären Antikörper detektiert wurde und grün erscheint. Die Grössenbalken in den Abbildungen entsprechen 50 μm (B+C) bzw. 20 μm (A,D,E,F).

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnten weitere Proteine, die u.a. an der Bildung der fokalen Kontakte beteiligt sind, in den primären Gefäßmuskelzellen dargestellt werden. In Abb. 11 A ist das Strukturprotein Vinkulin mit dem

4. Ergebnisse

Fluoreszenzfarbstoff Cy 3 markiert und erscheint rot. Zu sehen ist ein Ausschnitt aus einer Zelle, der bei einem Durchmesser von 10 – 20 μm eine Länge von ca. 60 μm aufweist. Das Bild zeigt die punktförmige Verteilung des Proteins an Stellen in der Peripherie der Zelle, an welchen die Kontakte der Zelle zur EZM liegen. Aktinin ist in Abb. 11 B mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy 3 markiert und kommt rot zur Darstellung. Zu sehen sind in diesem Bild mehrere GMZ die in ihrer Längenausdehnung etwa 50 - 100 μm messen. Aktinin ist in der Zelle, wie im Bild erkennbar, linienförmig in der Zellperipherie lokalisiert. In Abb. 11 D wurden die GMZ mit zwei verschiedenen Farbstoffen behandelt. In dieser Doppelfärbung erscheint das Protein Talin, mit Cy 3 markiert, rot und das Aktinzytoskelett, durch Phalloidin-Alexa 488 detektiert, grün. Zu sehen ist ein etwa 80 μm langer und ca. 60 μm breiter Zellausschnitt. Es wird eine Assoziation des in der Zellperipherie liegenden Talin Signals mit dem Aktinzytoskelett deutlich. Das Protein ist in der Abbildung an den Enden der Aktinfasern lokalisiert. In einem weiteren Ansatz wurde die „focal adhesion kinase“ (FAK), eine Tyrosinkinase, mit Cy 3 markiert und erscheint in Abb. 11 C rot. Dargestellt ist eine Zelle mit einer Längenausdehnung von ca. 150 μm . FAK liegt hauptsächlich clusterförmig am Zellrand vor. In Abb. 11 E wurde mit Hilfe Antikörpers, welcher mit dem Immunfluoreszenzfarbstoff Cy 2 markiert wurde, die Tyrosinphosphorylierung, ein Indiz für eine Aktivierung von Proteinen, kenntlich gemacht. In der Zelle ist die Tyrosinphosphorylierung, grün zu erkennen, v. a. fokal in der Peripherie der ca. 80 μm grossen Zelle lokalisiert. Weiterhin wurde das Strukturprotein Myosin mit dem Farbstoff Cy 3 markiert und kommt in Abb. 11 F rot zur Darstellung. Zu erkennen ist die perlschnurartige Anordnung der Myosinfilamente, in dem etwa 60 μm messenden Zellausschnitt.

4.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion

Nachdem die primären GMZ anhand von Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert und die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf den Zellen nachgewiesen wurden, sollte in diesem Teil der Arbeit die Integrin - vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen, nach Inkubation mit einem serumarmen Medium über Nacht, mit Trypsin/EDTA in Suspension gebracht. Die suspendierten Zellen wurden für 1 h inkubiert, um die Aktivierung der Rezeptor – vermittelten Signalkaskaden, bei nun fehlender Interaktion mit der EZM, auf ein Basalniveau zu reduzieren. Anschliessend wurden die GMZ auf mit verschiedenen Proteinen beschichtete Zellkulturschalen ausgebracht. Durch die Bindung der Integrine an diese Proteine wurden Signale induziert, welche mittels Western Blot Analysen untersucht werden konnten. Als Kontrollen wurden bei diesen Versuchen jeweils die folgenden zwei Ansätze verwendet. Einerseits erfolgte eine direkte Zentrifugation der suspendierten Zellen. Diese GMZ wurden ohne Proteinstimulation lysiert. So konnte das Ausgangsniveau der Tyrosinphosphorylierung festgehalten werden. Andererseits wurden die GMZ auf mit Polylysin beschichtete Zellkulturschalen ausgebracht. Polylysin stellt einen Stoff dar, auf dem Zellen unspezifisch adhärieren, ohne dass dafür eine Rezeptor/Ligand Interaktion notwendig wäre. Dadurch sollte gezeigt werden, dass es sich bei den induzierten Signalen um eine spezifische, Integrin-vermittelte Aktivierung handelt.

4.2.1 Stimulation der Gefäßmuskelzellen durch Adhäsion auf Vitronektin

In diesem „Replating“ Versuch wurde untersucht, welche intrazellulären Signale durch Adhäsion der GMZ auf dem EZM Protein Vitronektin induziert werden.

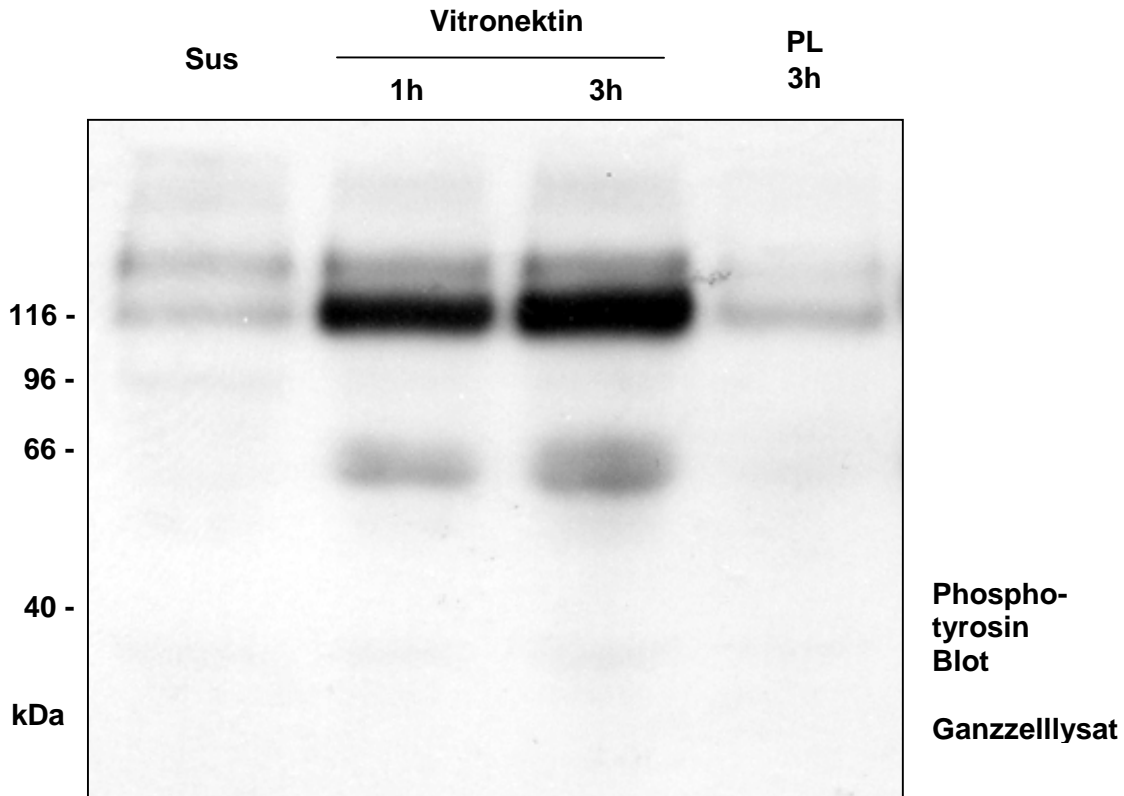


Abb. 12 Adhäsion der GMZ auf Vitronektin induziert eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung

Die GMZ wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubiert, am nächsten Tag mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und für 1 h in Suspension gehalten. Im Suspensionsansatz (Sus) wurden die Zellen direkt ohne Proteinstimulation lysiert. In den anderen Ansätzen wurden die GMZ für verschiedene lange Zeiten auf mit 5 µg/ml Vitronektin (Vitronektin 1 h, 3 h) bzw. auf mit 50 µg/ml Polylysin beschichtete Zellkulturschalen (PL 3 h) ausgebracht. Dargestellt ist ein Western Blot des Ganzzelllysats, der mit einem monoklonalen Phosphotyrosinantikörper behandelt wurde.

Die Abbildung zeigt einen Western Blot, der mit einem monoklonalen Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine behandelt wurde. Zu sehen sind vier verschiedene Ansätze. In der ersten Spur, dem Suspensionsansatz (Sus), lässt sich das Basalniveau der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung (PTyr) erkennen. Bei diesem Ansatz wurden die suspendierten Zellen direkt ohne Proteinstimulation lysiert. Die Integrine kamen nicht in Kontakt mit einem Liganden. Daneben sehen wir die durch

4. Ergebnisse

Adhäsion der GMZ auf einer mit Vitronektin beschichteten Oberfläche induzierte PTyr nach 1 bzw. 3 h (Vitronektin 1 h, 3 h). Es wird deutlich, dass die Stimulation der primären GMZ mit dem EZM Protein Vitronektin zu einer massiv erhöhten PTyr, v.a. einer Proteinbande der Grösse von ca. 116 kDa führte. Auch bei ca. 60 kDa und ca. 130 kDa wurde eine verstärkte PTyr induziert. Diese Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung ist schon nach 1 h ausgeprägt, nimmt nach 3 h noch zu und deutet auf eine Aktivierung von Proteinen dieser Grösse hin. In einem vierten Ansatz dienten Zellkulturschalen, die mit Polylysin beschichtet wurden, als Kontrolle (PL 3 h). Hierauf adhärten die Zellen ohne eine spezifische Rezeptor/Ligand Interaktion. Die Tyrosinphosphorylierung blieb auf dem Ausgangsniveau, das dem Suspensionsansatz (Sus) entspricht. Es wurde keine erhöhte PTyr durch die unspezifische Adhäsion induziert.

4.2.2 Lokalisation des Phosphotyrosin- und FAK-Antikörpersignals intrazellulär

Da die Proteinbande der Grösse von ca. 116 kDa die höchste Zunahme der Tyrosinphosphorylierung zeigte, sollte untersucht werden, ob es sich bei diesem Protein, evtl. um die „focal adhesion kinase“ (FAK) handelt. Zunächst sollte mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden, ob die Signale des FAK und des PTyr Antikörpers in den GMZ an den gleichen Orten vorliegen. Eine Kolokalisation würde einen Hinweis geben, dass es sich bei dem deutlich verstärkt tyrosinphosphorylierten Protein um FAK handelt.

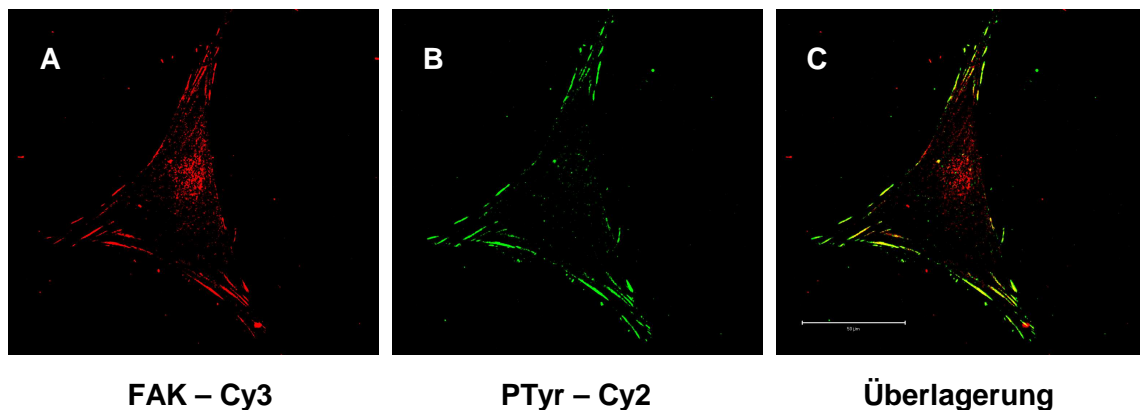


Abb. 13 Kolokalisation des FAK und Phosphotyrosin Antikörper Signals

Die Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach 24 h mit Aceton fixiert. Anschliessend wurden sie mit einem polyklonalen FAK und einem monoklonalen PTyr Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt wurde der FAK Antikörper mit einem Cy 3 markierten (A) bzw. der Phosphotyrosin Antikörper mit einem Cy 2 markierten sekundären Antikörper (B) detektiert. Cy 3 ist in der Abbildung rot (A), Cy 2 grün (B) und die Kolokalisation beider Farbstoffe in der Überlagerung (C) gelb dargestellt. Der Grössenbalken entspricht 50 μm .

In der Abbildung ist eine GMZ zu erkennen, die einen Durchmesser von etwa 70 μm aufweist. In Abb. 13 A ist die „focal adhesion kinase“ rot dargestellt. Die Tyrosinphosphorylierung ist in Abb. 13 B grün zu erkennen. Beide Signale lagen in der Zelle hauptsächlich strichförmig in der Zellperipherie vor. In der Überlagerung (Abb. 13 C) ergibt sich aus der Kolokalisation der beiden Signale eine gelbe Falschfarbe. Es wird deutlich, dass FAK und PTyr in der GMZ oftmals an dem gleichen Ort vorlagen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte auf die Ebene der Kontakte der Zelle zur extrazellulären Matrix fokussiert werden. Beide Signale lagen in dieser Ebene vor. Dieses Ergebnis gab einen Hinweis, dass es sich bei dem ca. 116 kDa

grossen Protein mit erhöhter Tyrosinphosphorylierung um die „*focal adhesion kinase*“ handeln könnte.

4.2.3 Stimulation der Gefässmuskelzellen durch Adhäsion auf Vitronektin, Fibronektin und Kollagen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der GMZ auf dem EZM Protein Vitronektin einen guten Stimulus für die Induktion einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung darstellt. Der vorangehende Versuch wies darauf hin, dass es sich bei dem verstärkt tyrosinphosphorylierten, etwa 116 kDa grossen, Protein um FAK handeln könnte. Dies bestätigte sich in einer Immunpräzipitation (siehe 4.2.6). Es sollte nun untersucht werden, ob und wie stark die Adhäsion auf anderen EZM Proteine in der Lage ist eine Phosphorylierung von FAK zu induzieren. Hierzu wurde ein polyklonaler FAK Antikörper verwendet, der an den phosphorylierten Tyrosinrest 397 (P-Y397 FAK) der „*focal adhesion kinase*“ bindet. Zur Stimulation der GMZ wurden bei diesem Versuch neben mit Vitronektin auch mit Fibronektin und Kollagen beschichtete Oberflächen eingesetzt. Als Kontrollen dienten ein Suspensions- und ein Polylysinansatz.

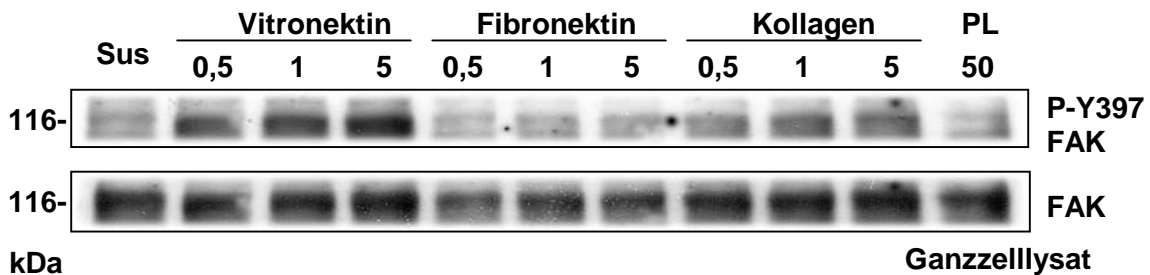


Abb. 14 FAK Phosphorylierung bei Stimulation der GMZ durch Adhäsion auf Vitronektin, Fibronektin und Kollagen

Die über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubierten Zellen wurden von den Zellkulturschalen abgelöst, für 1 h in Suspension gehalten und anschliessend auf die mit verschiedenen Proteinen beschichteten Oberflächen ausgebracht. Nach 1 h Inkubation wurden die GMZ lysiert. Als Proteine für die Beschichtung wurden Vitronektin, Fibronektin und Kollagen in den Konzentrationen 0,5, 1 und 5 µg/ml eingesetzt. In einem Suspensionsansatz (Sus) wurden die GMZ direkt lysiert ohne auf einer Zellkulturschale zu adhären. Als Kontrolle diente die Adhäsion der GMZ auf mit 50 µg/ml Polylysin beschichteten Oberfläche (PL). Der obere Western Blot wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen den phosphorylierten Aminosäurerest 397 der „*focal adhesion kinase*“ (P-Y397 FAK), der untere mit einem monoklonalen FAK Antikörper behandelt. Untersucht wurden die Ganzzelllysate.

4. Ergebnisse

In der Abbildung ist ein Western Blot dargestellt, der mit zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert wurde. Der obere Blot wurde mit einem polyklonalen FAK Antikörper behandelt, der gegen den phosphorylierten Tyrosinrest 397 dieses Proteins gerichtet ist. Bei dem abgebildeten unteren Western Blot wurde ein monoklonaler FAK Antikörper eingesetzt, der die Gesamtmenge der vorhandenen „focal adhesion kinase“ zeigt. In der ersten Spur kann man erkennen, dass nur eine geringe basale Phosphorylierung an dem Aminosäurerest 397 von FAK vorliegt. In den Spuren 2 – 10 wurden die GMZ durch Adhäsion auf den Proteinen Vitronektin, Fibronektin bzw. Kollagen in Konzentrationen von 0,5 bis 5 µg/ml stimuliert. Es zeigte sich, dass das EZM Protein Vitronektin verglichen mit den anderen Proteinen den stärksten Stimulus für eine Tyrosinphosphorylierung von FAK am Aminosäurerest 397 darstellt. Schon geringe Konzentrationen dieses Proteins induzierten eine deutliche Tyrosinphosphorylierung. Auch eine Kollagenstimulation bewirkte in höheren Konzentrationen (5µg/ml) eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung der „*focal adhesion kinase*“. Fibronektin führte bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml nicht zu einer verstärkten PTyr. Eine Adhäsion der GMZ auf Polylysin konnte die Tyrosinphosphorylierung von FAK am Tyrosinrest 397 nicht erhöhen. Mit dem verwendeten monoklonalen FAK Antikörper konnte im unteren Western Blot der Abbildung gezeigt werden, dass in allen Ansätzen äquivalente Proteinmengen vorlagen.

4.2.4 Untersuchung der induzierten Tyrosinphosphorylierung nach Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin, Fibronektin und Kollagen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Mikroskopie sollte die, durch Adhäsion der GMZ auf mit den verschiedenen Proteinen beschichteten Oberflächen, induzierte Tyrosinphosphorylierung in den Zellen untersucht und visualisiert werden.

In der Abbildung ist die Tyrosinphosphorylierung rot dargestellt, die durch Stimulation der GMZ mit den verschiedenen EZM Proteine induziert wurde. In der linken Spalte ist isoliert das Farbstoffsignal in rot zu erkennen (Abb. 15 A,C,E). In der rechten Spalte sieht man eine Überlagerung dieses Signals mit dem Phasenkontrastbild der untersuchten Zelle (Abb. 15 B,D,F). Abgebildet ist jeweils eine Zelle. Mit dem Konfokalmikroskop wurde auf die Ebene der Zell-Matrix Interaktion fokussiert. Vitronektin (Abb. 15 A,B) war am stärksten in der Lage eine erhöhte PTyr zu induzieren. Auch Kollagen Stimulation (Abb. 15 E,F) führte zu einer erhöhte PTyr in der Zelle. In der Untersuchung der auf Fibronektin adhären GMZ (Abb. 15 C,D) zeigte sich nur eine schwache Tyrosinphosphorylierung. In der Überlagerung mit dem Durchlichtbild (Abb. 15 B,D,F) wird deutlich, dass die induzierte Tyrosinphosphorylierung hauptsächlich strich- bzw. punktförmig an den Zellrand orientiert ist. Hier bauen die Zellen über die Integrinrezeptoren die Verbindungen zu den Proteinen der EZM auf. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nach der Inkubation von einer Stunde die Zellen auf Fibronektin (Abb. 15 D) eine deutlich kleinere Ausbreitung („Spreading“) auf der beschichteten Oberfläche als auf Vitronektin (Abb. 15 B) und Kollagen (Abb. 15 F) zeigten. Bei der Adhäsion auf Fibronektin weist die Zelle einen Durchmesser von ca. 30 µm auf, wohingegen die Zellen auf Vitronektin bzw. Kollagen ca. 50 µm im Durchmesser umfassen.

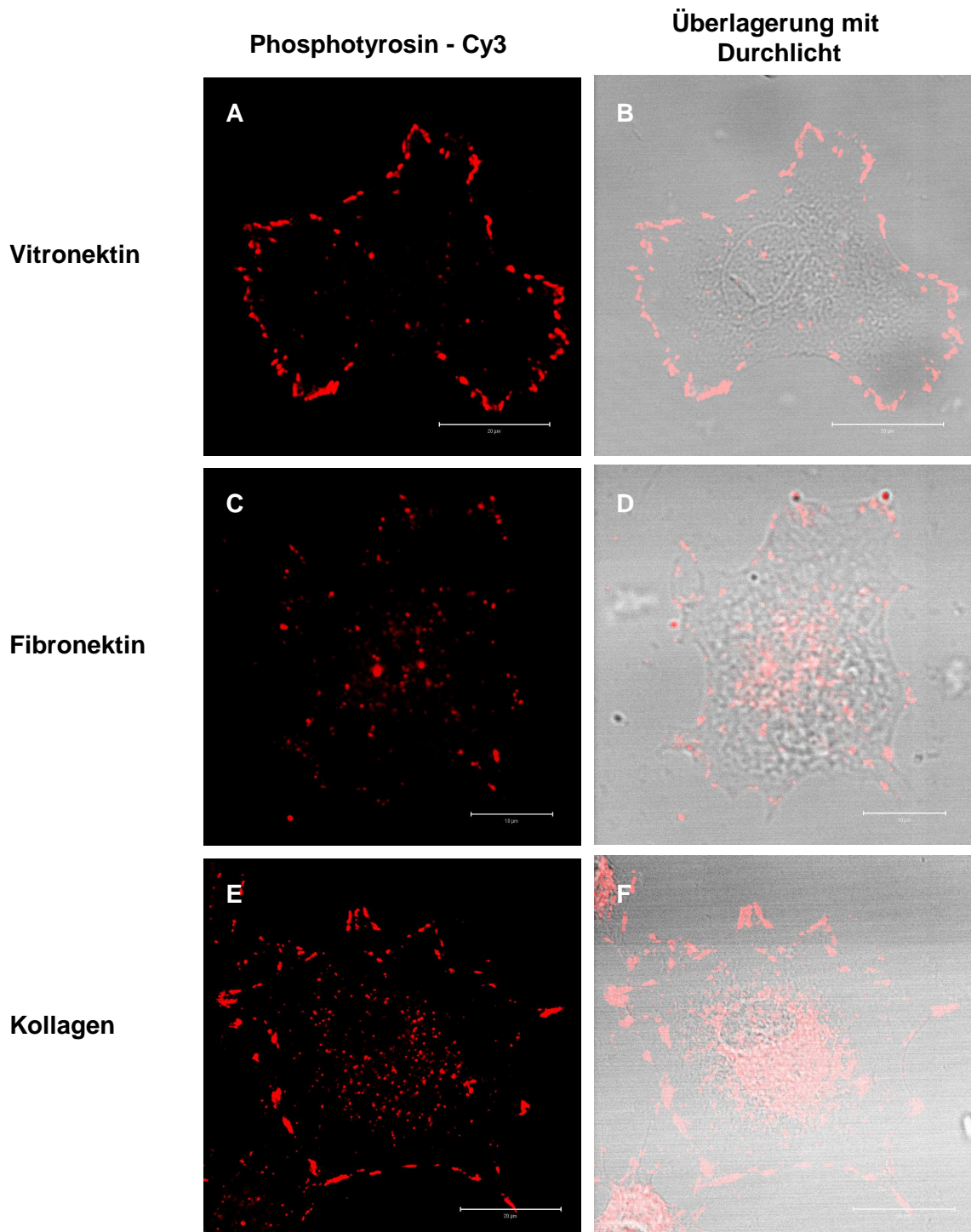


Abb. 15 Tyrosinphosphorylierung nach Adhäsion

Die GMZ wurden wie bei dem Versuch zuvor behandelt. Die Deckgläschen, auf welche die Zellen ausgebracht wurden, waren mit den angegebenen Proteinen in der Konzentration 5 µg/ml beschichtet. Nach der Inkubation von 1 h wurden die Zellen, nicht wie im Versuch zuvor lysiert, sondern mit Aceton fixiert. Die GMZ wurden mit einem monoklonalen Phosphotyrosin Antikörper behandelt, der in einem zweiten Schritt mit einem Cy 3 markierten sekundären Antikörper detektiert wurde. Das Cy 3 Signal ist in rot dargestellt. Die Abb. A,C und E zeigen das Farbstoffsignal. In den Abb. B,D,F ist eine Überlagerung mit dem Phasenkontrastbild der untersuchten Zelle zu sehen. Die Grössenbalken entsprechen 20 µm (A,B,E,F) bzw. 10 µm (C,D).

4.2.5 Einfluss des Integrininhibitors Cilengitide auf die induzierte Tyrosinphosphorylierung bei Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin

In den zuvor durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der GMZ auf dem EZM Protein Vitronektin im Vergleich zu der Adhäsion auf Kollagen und Fibronektin den stärksten Stimulus für die Integrin vermittelte Induktion einer Tyrosinphosphorylierung darstellt. Nun sollte untersucht werden, ob durch den α_v Integrininhibitor die verstärkte PTyr der Zellen verhindert werden kann und welche Konzentrationen des Hemmstoffes für eine suffiziente Abschwächung nötig sind.

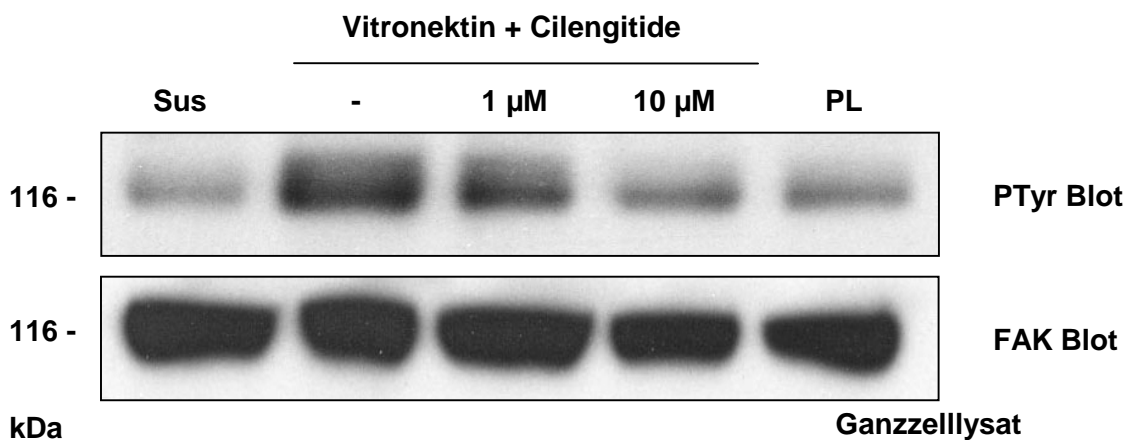


Abb. 16 Cilengitide inhibiert die durch Adhäsion auf Vitronektin induzierte PTyr

Die GMZ wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubiert und am nächsten Tag mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst. Es folgte eine einstündige Inkubation der Zellsuspension, wobei nach 45 min der Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt wurde. Dann wurden die GMZ für 1 h auf mit 5 μ g/ml Vitronektin bzw. mit 50 μ g/ml Polylysin (PL) beschichtete Zellkulturschalen inkubiert und anschliessend lysiert. Der Suspensionsansatz (Sus) wurde direkt lysiert. Mittels Western Blot Analysen wurden die Ganzzelllysate untersucht. Der obere Blot wurde mit einem monoklonalen Phosphotyrosin, der untere mit einem monoklonalen FAK Antikörper behandelt.

In der Abbildung ist eine Western Blot Analyse eines Ganzzelllysats dargestellt. Der obere Teil zeigt einen mit einem PTyr Antikörper behandelten Blot. In der ersten Spur ist das Ausgangsniveau der Tyrosinphosphorylierung in den suspendierten GMZ zu erkennen. Dieser Ansatz wurde ohne Stimulation durch Adhäsion auf einer Protein beschichteten Oberfläche direkt lysiert. Die GMZ deren Lysate in den Spuren 2 bis 4 dargestellt sind, adhärirten auf mit VN beschichteten Zellkulturschalen. Der Inhibitor wurde den Zellen in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die Spur 2 zeigt

4. Ergebnisse

die induzierte PTyr durch Adhäsion auf VN ohne Inhibitor. In den Spuren 3 und 4 ist zu erkennen, dass der verwendete kompetitive α_v Integrininhibitor zu einer signifikanten Abnahme der Tyrosinphosphorylierung des 116 kDa Proteins führte. Schon bei einer Konzentration von 1 μM sank die Tyrosinphosphorylierung deutlich. 10 μM des Inhibitors verringerten die Stärke des Signals auf das Basalniveau, welches im Suspensionsansatz (Sus) erkennbar ist. Der untere Teil der Abbildung stellt einen Blot dar, der mit einem monoklonalen FAK Antikörper behandelt wurde, und zeigt, dass in allen Ansätzen äquivalente Proteinmengen vorhanden waren.

4.2.6 Identifikation des 116 kDa Proteins mittels Immunpräzipitation

Mit einem Teil der im Versuch zuvor für den Western Blot verwendeten Ganzzelllysate wurde eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen FAK Antikörper durchgeführt. Es sollte hierdurch bestätigt werden, dass es sich bei dem Protein der Grösse von ca. 116 kDa, wie vermutet, um die „*focal adhesion kinase*“ handelte.

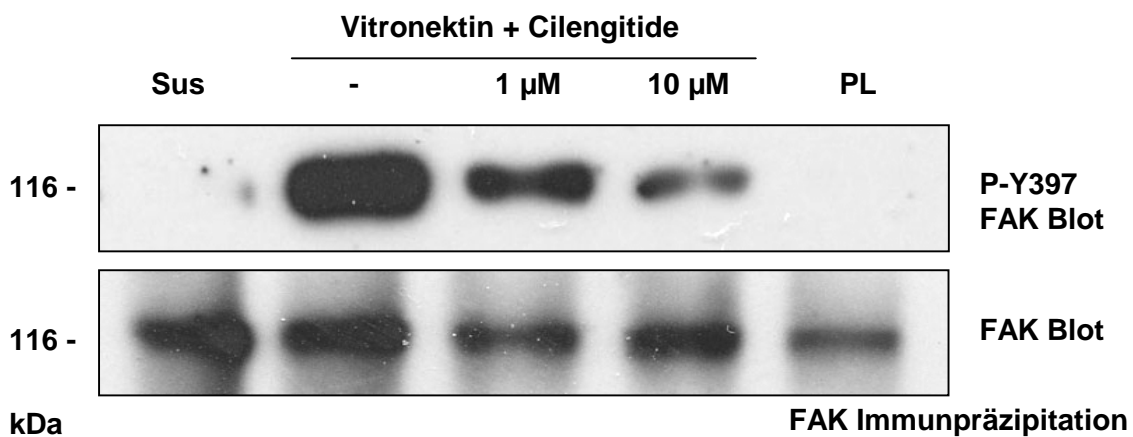


Abb. 17 Identifikation der „*focal adhesion kinase*“ durch Immunpräzipitation

Mit einem Teil der im Versuch zuvor gewonnenen Ganzzelllysate wurde eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen FAK Antikörper durchgeführt. Die Proben wurden für 4 h bei 4 ° C mit dem polyklonalen FAK Antikörper inkubiert. Anschliessend wurden den Ansätzen Protein A/G Agarosebeads hinzugefügt und durch Zentrifugation die Präzipitate gewonnen. Diese wurden mittels Western Blot analysiert. Der obere Blot wurde mit einem polyklonalen Phosphotyrosin 397 FAK (P-Y397 FAK), der untere mit einem monoklonalen FAK Antikörper behandelt. Dargestellt sind die selben Ansätze, wie im Versuch zuvor beschrieben.

Dargestellt ist die Untersuchung der mittels Immunpräzipitation gewonnen Proben mit Hilfe von Western Blot Analysen. Der obere Blot wurde mit einem Antikörper gegen

4. Ergebnisse

den phosphorylierten Tyrosinrest 397 von FAK behandelt. Der untere Blot zeigt nach Inkubation mit einem monoklonalen FAK Antikörper die absolut in den verschiedenen Ansätzen enthaltenen Mengen der „focal adhesion kinase“. Es handelte sich wie bei dem Versuch zuvor beschrieben um fünf verschiedene Ansätze. In der ersten Spur ist der Suspensionsansatz ohne Stimulation durch Adhäsion auf einem EZM Protein dargestellt. Spur 2 bis 4 zeigen die Ansätze nach Adhäsion auf Vitronektin ohne (Spur 2) bzw. mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 1 μM (Spur 3) bzw. 10 μM (Spur 4). In der fünften Spur ist das Präzipitat der Zellen zu erkennen, die auf Polylysin adhärten. FAK konnte in allen Präzipitaten der Ganzzelllysate nachgewiesen werden. Es bestätigte sich durch die Immunpräzipitation, dass es sich bei dem ca. 116 kDa grossen Protein um FAK handelte. Ausserdem zeigte sich, dass die Tyrosinphosphorylierung am Aminosäurerest 397 von FAK, äquivalent zu der im Versuch zuvor dargestellte Tyrosinphosphorylierung, durch Cilengitide klar vermindert wurde. In der aus dem Suspensionsansatz gewonnenen Probe war keine basale PTyr von FAK an diesem Aminosäurerest zu erkennen. Durch die unspezifische Adhäsion der GMZ auf Polylysin wurde keine PTyr von FAK induziert. Es konnten in allen Ansätzen äquivalente Mengen von FAK nachgewiesen werden.

4.2.7 Untersuchung der Veränderungen durch Cilengitide bei Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei einer Wiederholung des zuvor durchgeführten Versuchs wurden die Zellen nicht lysiert, sondern mit Aceton fixiert und für eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Phosphotyrosin Antikörper behandelt. Die Veränderung an den GMZ durch den Einsatz des Inhibitor sollten durch bildgebende Methoden visualisiert werden.

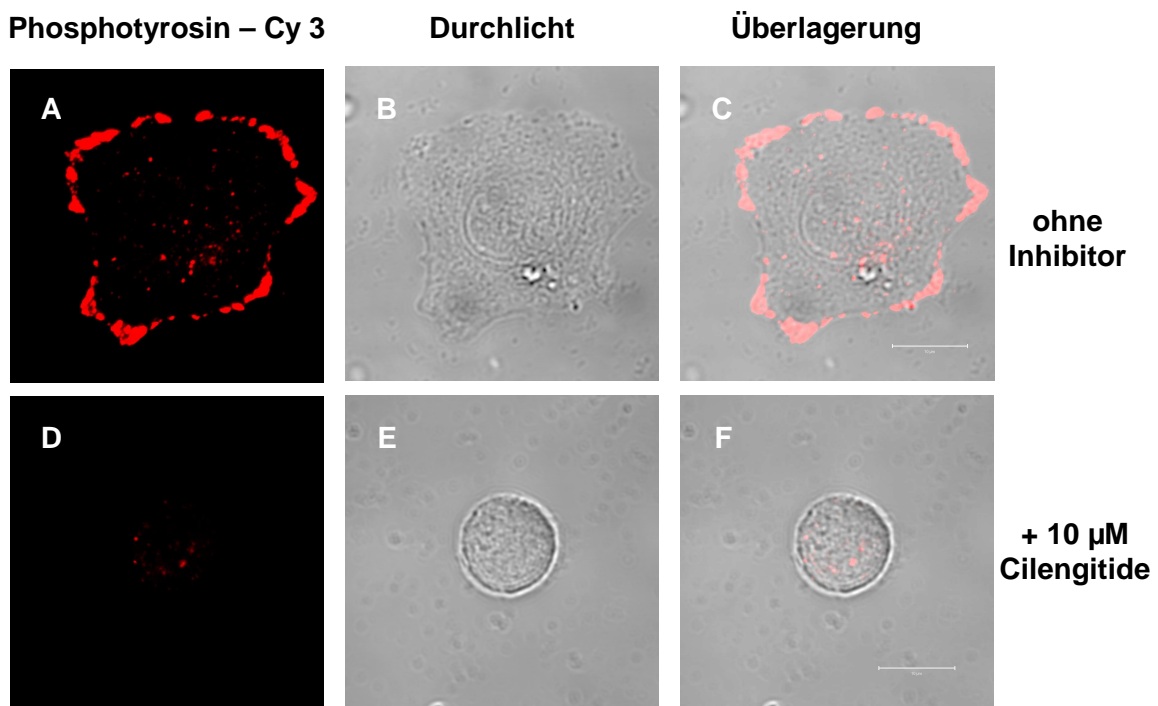


Abb. 18 Einfluss von Cilengitide auf die Tyrosinphosphorylierung bei Adhäsion der GMZ auf Vitronektin

Die Zellen wurden wie bei dem Versuch zuvor beschrieben behandelt. Sie wurden auf mit 5 µg/ml Vitronektin beschichtete Deckgläschen ausgebracht und ohne (A-C) bzw. mit 10 µM Cilengitide (D-E) in Suspensionsmedium für 1 h inkubiert. Es folgte eine Fixierung mit Aceton. Die Färbung wurde mit einem monoklonalen Phosphotyrosin Antikörper durchgeführt, welcher mit einem sekundären Cy 3 markierten Antikörper, hier rot dargestellt, detektiert wurde. Der Grössenbalken entspricht jeweils 10 µm.

Zu sehen ist in der Darstellung eine Immunfluoreszenzfärbung je einer GMZ mit einem PTyr Antikörper nach Adhäsion auf Vitronektin ohne bzw. mit 10 µM Cilengitide. In der oberen Zeile (Abb. 18 A - C) ist eine Zelle abgebildet, die ohne den Einfluss des

4. Ergebnisse

Inhibitor auf Vitronektin adhären konnte. Die untere Zeile der Abbildung (Abb. 18 D - F) zeigt eine Zelle, die mit 10 μM Cilengitide inkubiert wurde. In der ersten Spalte ist isoliert das Cy 3 Signal, das der intrazellulären PTyr entspricht, dargestellt. Die zweite Spalte zeigt das Phasenkontrastbild in der Durchlichtmikroskopie. In der dritten Spalte ist eine Überlagerung beider Bilder zu sehen. Während die Zellen ohne den Inhibitor eine deutliche Tyrosinphosphorylierung zeigten (Abb. 18 A), wurde diese durch die α_v Integrinblockade in einer Konzentration von 10 μM vollständig verhindert (Abb. 18 D). Ausserdem zeigte sich, dass die Zellen, denen der Hemmstoff zugesetzt wurde, zwar auf der Oberfläche adhärten, aber nach der Inkubationszeit von 1 h abgerundet blieben (Abb. 18 E). Sie zeigen einen Durchmesser von etwa 10 μm . Die Zellen ohne Inhibitor breiteten sich dagegen deutlich auf dem mit Vitronektin beschichteten Untergrund aus und erreichten in dieser Zeit einen Durchmesser von etwa 25 μm (Abb. 18 B).

4.2.8 Cilengitide Wirkung bei Adhäsion der Gefässmuskelzellen auf Kollagen und Fibronektin

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der GMZ auf dem EZM Protein Vitronektin den stärksten Stimulus für eine Erhöhung der intrazellulären PTyr, v.a. von FAK, darstellt. Diese erhöhte PTyr konnte durch den Hemmstoff in einer Konzentration von 10 μM deutlich abgeschwächt werden. Es sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, wie sich Cilengitide auf die Stimulation der Zellen durch Adhäsion auf Kollagen und Fibronektin auswirkt.

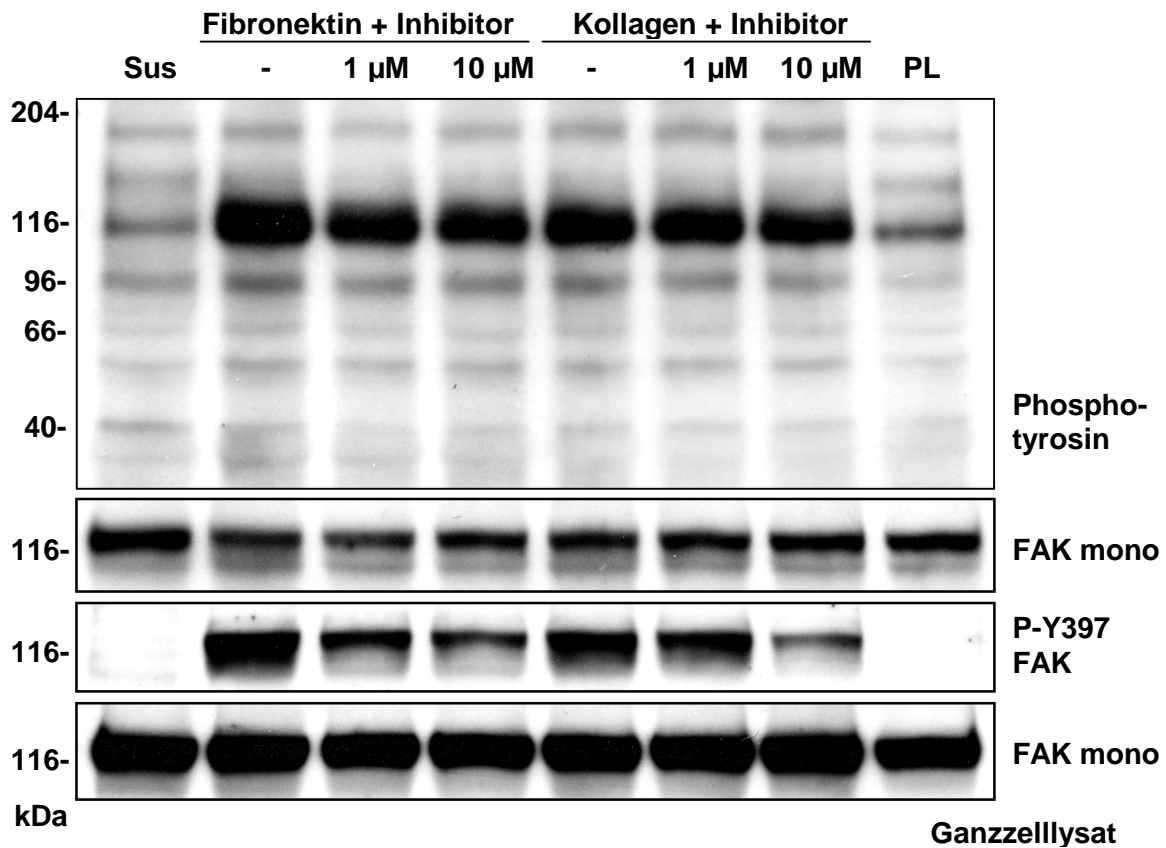


Abb. 19 Einfluss von Cilengitide bei Stimulation durch Adhäsion auf Fibronectin bzw. Kollagen

Die Zellen wurden über Nacht mit serumarmen Medium inkubiert, mit Trypsin/EDTA abgelöst und für 1 h in Suspension gehalten. Nach 45 min wurde Cilengitide den Zellsuspensionen in den angegebenen Konzentrationen zugefügt. Anschliessend wurden die GMZ auf mit 20 μg/ml Fibronectin bzw. Kollagen beschichtete Zellkulturschalen ausgebracht und für 1 h inkubiert. Die GMZ wurden lysiert und die Ganzzelllysate untersucht. Die Western Blots wurden mit einem PTyr, einem FAK oder einem P-Y397 FAK Antikörper behandelt.

In der Abbildung sind vier Western Blot Analysen dargestellt. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen PTyr, gegen FAK oder gegen den phosphorylierten Aminosäurerest 397 von FAK behandelt. Spur 1 zeigt den Suspensionsansatz und somit das Ausgangsniveau der PTyr bzw. P-Y 397 von FAK. In Spur 2 – 4 sind die Proben nach Stimulation der GMZ durch Adhäsion auf Fibronectin ohne (Spur 2) bzw. unter Einfluss des Inhibitors in Konzentrationen von 1 μM (Spur 3) und 10 μM (Spur 4) zu erkennen. Analog hierzu erfolgte bei den Ansätzen, die in Spur 5 –7 zu sehen sind, die Stimulation durch Kollagen ohne (Spur 5) bzw. mit Inhibitor in einer Konzentration von 1 μM (Spur 6) bzw. 10 μM (Spur 7). Spur 8 zeigt die Polylysine Kontrolle. Fibronectin

und Kollagen Stimulation in Abwesenheit von Cilengitide führten zu einer deutlich gesteigerten Tyrosinphosphorylierung. Bei der Stimulation der GMZ mit diesen Proteinen stand wiederum die erhöhte PTyr der ca. 116 kDa Proteinbande im Vordergrund. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen waren lediglich gering in der Lage diese abzuschwächen. Die Ganzzelllysate wurden anschliessend mit einem polyklonalen P-Y 397 FAK Antikörper analysiert. Cilengitide konnte mit steigender Konzentration die Tyrosinphosphorylierung am Aminosäurerest 397 von FAK signifikant abschwächen. Es wurden jeweils äquivalente FAK Mengen durch den monoklonalen FAK Antikörper in allen Ansätzen nachgewiesen.

4.2.9 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf kultivierte adhärenzte Gefässmuskelzellen

In den Versuchen zuvor wurde u.a. untersucht, wie Cilengitide die Stimulation durch Adhäsion auf den EZM Proteinen der zuvor suspendierten GMZ hemmt. Es wurde gezeigt, dass der Integrininhibitor in der Lage ist, die Tyrosinphosphorylierung der Zellen und im besonderen der „focal adhesion kinase“ deutlich abzuschwächen. Die Wirkung des Hemmstoffes auf kultivierte adhärenzte GMZ war noch nicht untersucht worden.

Hierzu wurde der α_v Integrininhibitor in verschiedenen Konzentrationen den adhärenzten Zellen hinzugefügt und diese Zellen 7 Tage mit dem Hemmstoff weiterkultiviert.

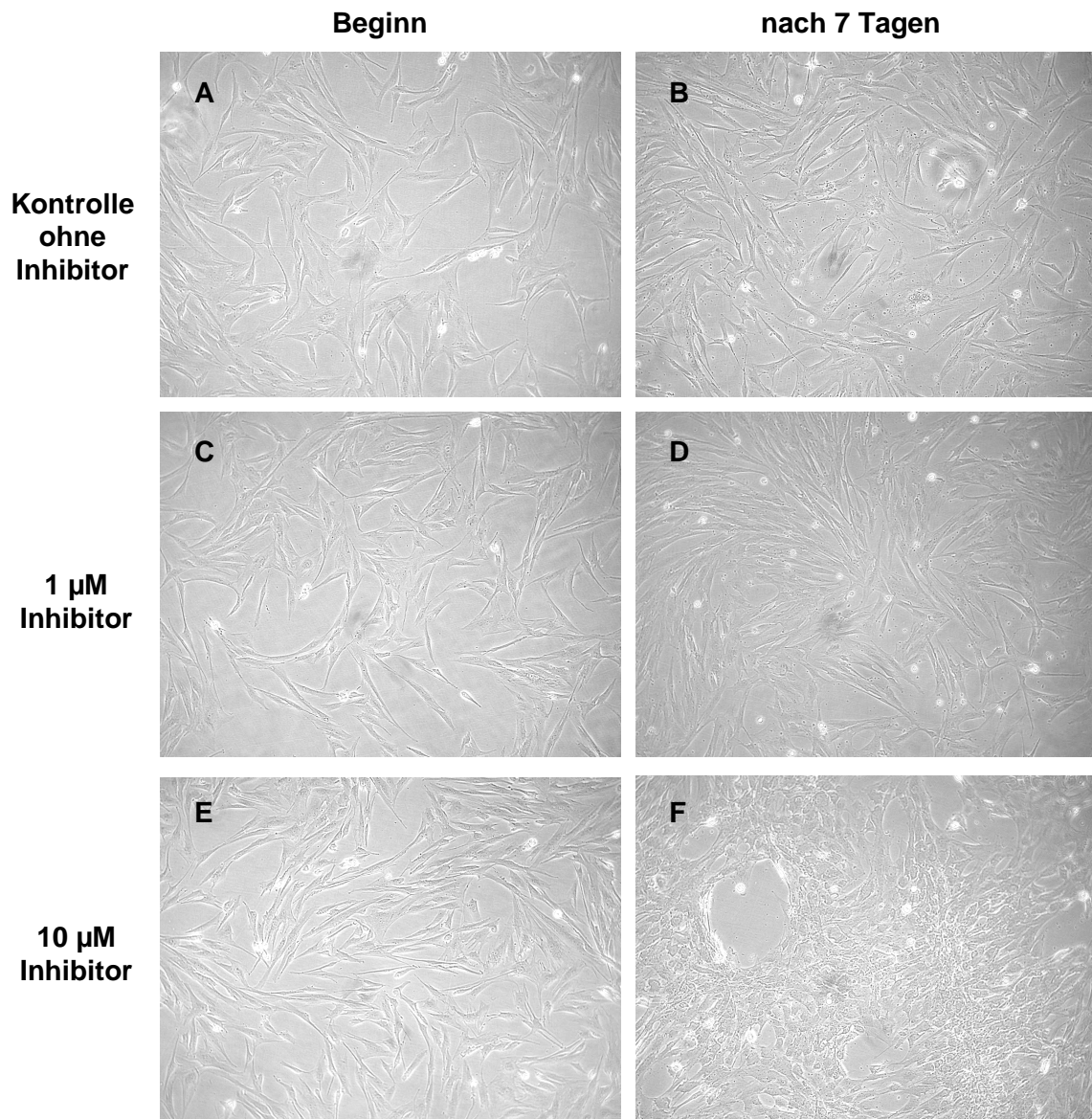


Abb. 20 Kultivierung der GMZ für 7 Tage ohne bzw. mit Cilengitide

Die GMZ wurden für 7 d ohne (A+B), mit 1 µM (C+D) bzw. mit 10 µM (E+F) des Inhibitors kultiviert. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der kultivierten GMZ bei Versuchsbeginn (A,C,E) und nach 7 Tagen (B,D,F) in der Phasenkontrastmikroskopie.

In der Abbildung dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der kultivierten GMZ. Die linke Spalte zeigt die Zellen zu Beginn des Versuchs. Die Bilder in der rechten Spalte wurden nach einer Inkubation der Zellen für 7 Tage aufgenommen. Dem Kulturmedium wurde Cilengitide nicht (Abb. 20 A+ B) bzw. in einer Konzentration von 1 µM (Abb. 20 C + D) oder 10 µM (Abb. 20 E + F) zugesetzt. In der Kontrolle ohne Inhibitor lässt sich das normale Wachstum der Zellkultur innerhalb von 7 Tagen erkennen. Die Zellen

4. Ergebnisse

zeigten unter dem Einfluss von 1 μM des Inhibitors in dieser Vergrößerung keinen im Vergleich zur Kontrolle erkennbaren Unterschied. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM rundeten sich die Zellen ab und erschienen im Vergleich zu den GMZ in den anderen Ansätzen kleiner, sie blieben jedoch vital und adhärent an der Oberfläche der Zellkulturschale.

4.2.10 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf das Aktinzytoskelett und die Tyrosinphosphorylierung kultivierter adhärenter Gefäßmuskelzellen

Der Versuch zuvor gab einen groben Ausblick auf die Wirkung von Cilengitide auf kultivierte, adhärenre GMZ. Die Auswirkungen auf die Einzelzelle sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen genauer untersucht werden, in denen das Aktinzytoskelett und PTyr dargestellt wurden.

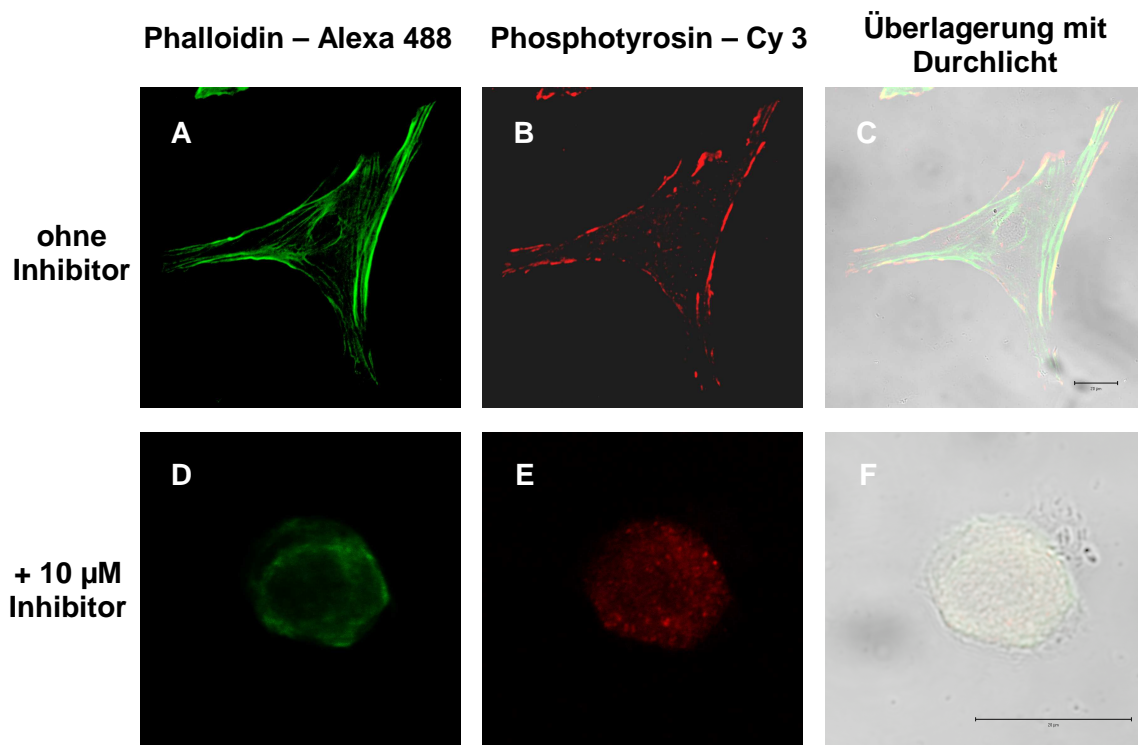


Abb. 21 Einfluss von Cilengitide auf kultivierte primäre Gefäßmuskelzellen

Die GMZ wurden auf mit Vitronektin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit serumhaltigem Medium ohne (A-C) bzw. mit 10 μM Cilengitide (D-F) für 30 min inkubiert und anschliessend mit Aceton fixiert. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin - Alexa 488 markiert, das hier grün dargestellt ist (A,D). Ausserdem wurden die Zellen mit einem monoklonalen Phosphotyrosin Antikörper behandelt, der mit einem sekundären Cy 3 markierten Antikörper detektiert wurde, hier rot zu erkennen (B,E). C und F zeigt die Überlagerung der beiden Farbstoffsignale mit dem Durchlichtbild der Zelle. Der Grössenbalken entspricht jeweils 20 μm.

Die Abbildung zeigt jeweils eine kultivierte primäre Gefäßmuskelzelle, die ohne (Abb. 21 A – C) bzw. mit Cilengitide in einer Konzentration von 10 μM (Abb. 21 D – F) inkubiert wurde. In der ersten Spalte ist das Aktinsignal in grün dargestellt. PTyr

4. Ergebnisse

erscheint in der mittleren Spalte rot. Die rechte Spalte zeigt eine Überlagerung der Farbstoffsignale mit dem Phasenkontrastbild der Zelle in der Durchlichtmikroskopie. Die kultivierte GMZ ohne Zusatz des Inhibitors umfasst eine Längenausdehnung von etwa 100 μm . Es ist ein deutlich ausgeprägtes Aktinzytoskelett grün zu erkennen (Abb. 21 A). Die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung ist deutlich rot zu erkennen und v.a. strichförmig an den Zellrand lokalisiert (Abb. 21 B). Der Inhibitor führte bei einer Konzentration von 10 μM zu einem Abrunden der Zellen (Abb. 21 F). Der Durchmesser sank im Vergleich zu der Zelle ohne Einfluss des Inhibitors von ca. 100 μm auf ca. 20 μm (Abb. 21 F) ab. Die GMZ blieben auf der Oberfläche adhärent. Das Aktinzytoskelett (Abb. 21 D) und die PTyr (Abb. 21 E) lagen in der dargestellten Zelle nach 30 Minuten Inkubation mit 10 μM Cilengitide nur noch diffus und schemenhaft vor.

4.3 Adhäsions Experimente

In diesem Teil der Arbeit sollte die Adhäsion der primären GMZ auf mit verschiedenen Proteinen beschichteten Oberflächen beobachtet werden. Es war zu untersuchen in wie weit die Art und die Konzentration des Proteins, mit dem die Zellkulturschalen beschichtet werden, auf die Anzahl der adhärierenden GMZ Einfluss nimmt. Im weiteren sollte auch der Einfluss der Blockade der α_V Integrine durch Cilengitide in verschiedenen Konzentrationen auf das Anheften der Zellen auf diesen Oberflächen analysiert werden.

4.3.1 Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit den Proteinen Fibronektin, Kollagen und Vitronektin beschichteten Oberflächen

In einem ersten Versuch wurden Zellkulturschalen mit den EZM Proteinen Fibronektin, Kollagen und Vitronektin in verschiedenen Konzentrationen beschichtet. Es sollte untersucht werden wie die Adhäsion der Zellen von der Art und der Konzentration des Proteins abhängig ist.

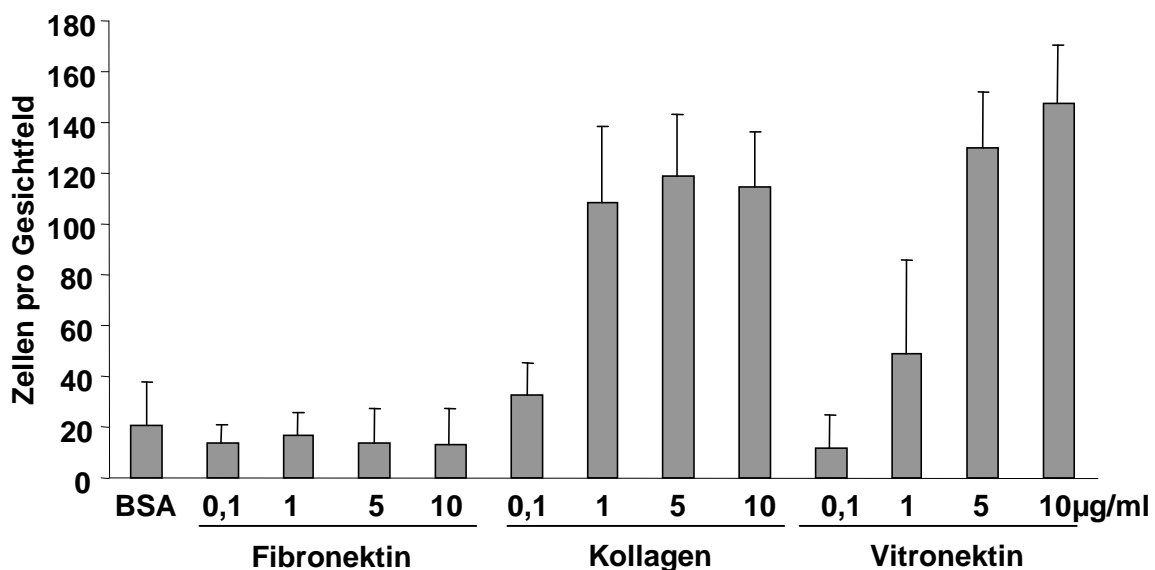


Abb. 22 Adhäsion der Zellen auf Fibronektin, Kollagen und Vitronektin

Die GMZ wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubiert, anschliessend mit Trypsin/EDTA abgelöst. 1×10^4 Zellen wurden nach einer einstündigen Inkubation in Suspension auf die mit den angegebenen Proteinen in verschiedenen Konzentrationen beschichteten Vertiefungen einer Zellkulturplatte ausgebracht. Die Oberflächen waren über Nacht bei 4°C mit den Proteinlösungen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und am nächsten Tag für 2 h mit dem Suspensionsmedium blockiert worden. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Proteinbeschichtung (BSA). Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h, nach der die Vertiefungen mit PBS gewaschen, die adhären Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt wurden. Die Zellanzahl wurde bei 100 x Vergrößerung ausgezählt. Es wurden 5 Felder pro Vertiefung für 3 Vertiefungen pro Ansatz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

In der Abbildung ist die Adhäsion der GMZ auf mit Fibronektin, Kollagen und Vitronektin in steigender Konzentration beschichteten Oberflächen dargestellt. Zu sehen sind die Mittelwerte der adhären Zellen pro Gesichtsfeld bei 100 x Vergrößerung

4. Ergebnisse

mit der berechneten Standardabweichung. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Oberfläche nicht mit einem Protein beschichtet wurde, auf der etwa 20 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt werden konnten (BSA). Zu erkennen ist, dass die GMZ auf Fibronectin bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml nicht besser adhären konnten als in der Kontrolle ohne Proteinbeschichtung. Auf Kollagen zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml ein starker Anstieg der an die Oberfläche gebundenen Zellzahl. Bei Konzentrationen bis 10 µg/ml blieb die Anzahl in etwa gleich. Es kam zu keinem weiteren Anstieg der Zellzahl. Auf Vitronectin erhöhte sich die Menge der Zellen pro Gesichtsfeld mit steigender Konzentration auf etwa 140 GMZ bei 10 µg/ml.

4.3.2 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf die Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit Vitronektin beschichteten Oberflächen

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie sich der α_v Integrininhibitor Cilengitide in verschiedenen Konzentrationen auf die Adhäsion der GMZ auf Vitronektin auswirkt.

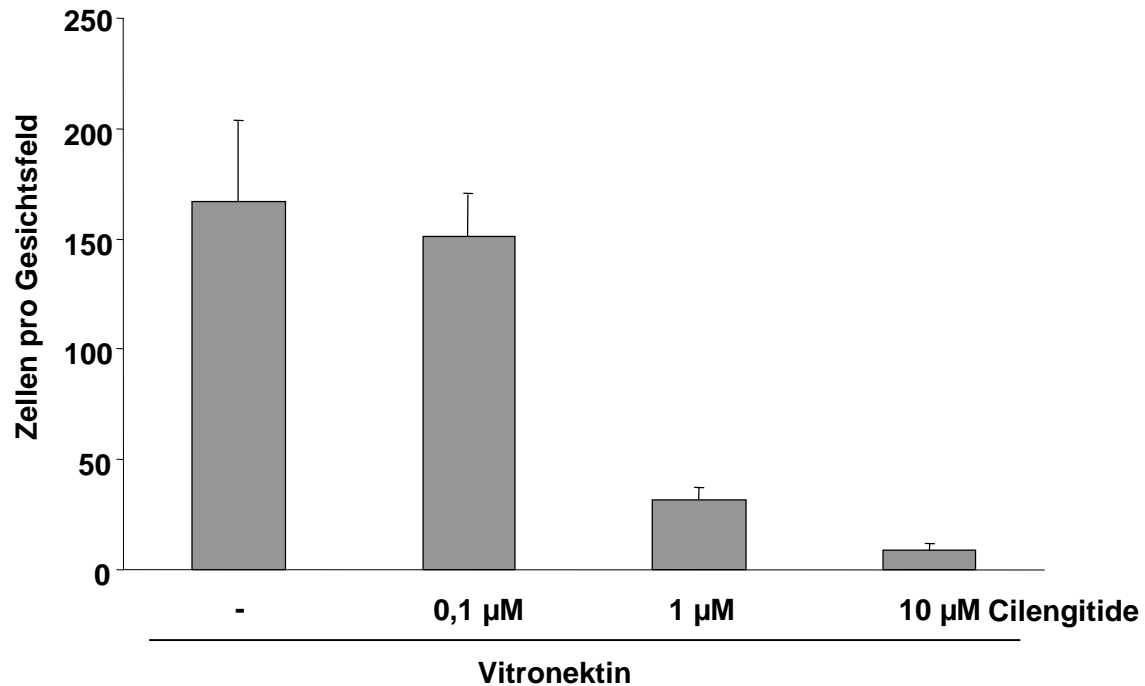


Abb. 23 Adhäsion der Zellen auf Vitronektin unter Einfluss von Cilengitide

Die Zellen wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubiert, dann mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und in Suspension gebracht. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei nach 45 min der Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt wurde. Danach wurden 1×10^4 GMZ auf die mit dem EZM Protein Vitronektin über Nacht bei 4°C in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichteten Vertiefungen ausgebracht. Die Oberflächen waren zuvor für 2 h mit dem Suspensionsmedium behandelt worden. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h, nach der die Zellen mit PBS gewaschen, fixiert und mit Kristallviolett angefärbt wurden. Die Anzahl der pro Gesichtsfeld auf den Oberflächen adhären Zellen wurde bei 100 x Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Bestimmt wurden 5 Felder pro Vertiefung für 3 Vertiefungen pro Ansatz. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

In der Abbildung sind die Mittelwerte mit der berechneten Standardabweichung der pro Gesichtsfeld adhären Zellen dargestellt. Die Oberflächen waren in allen Ansätzen mit einer Konzentration von 5 µg/ml Vitronektin beschichtet. Cilengitide wurde in den

angegebenen Konzentrationen den Zellsuspensionen hinzugefügt. Ohne Inhibitor konnten sich etwa 170 GMZ an die Oberfläche anheften. Cilengitide hatte in einer Konzentration von 0,1 μM in Anbetracht der Standardabweichung keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der Zellen auf diesem Protein. Eine Konzentration von 1 μM war deutlich in der Lage die Anheftung an den Untergrund zu hemmen und senkte die ausgezählte Zellzahl auf etwa 40 GMZ pro Gesichtsfeld. Die Adhäsion der GMZ konnte bei einer Konzentration von 10 μM annähernd vollständig verhindert werden. Nur noch etwa 10 GMZ konnten in diesem Ansatz gezählt werden.

4.3.3 Einfluss des Inhibitors auf die Adhäsion der Gefäßmuskelzellen auf mit Kollagen und Fibronektin beschichteten Oberflächen

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss des α_v Integrininhibitors Cilengitide auf die Anzahl der adhärierenden GMZ auf den EZM Proteinen Kollagen und Fibronektin untersucht werden.

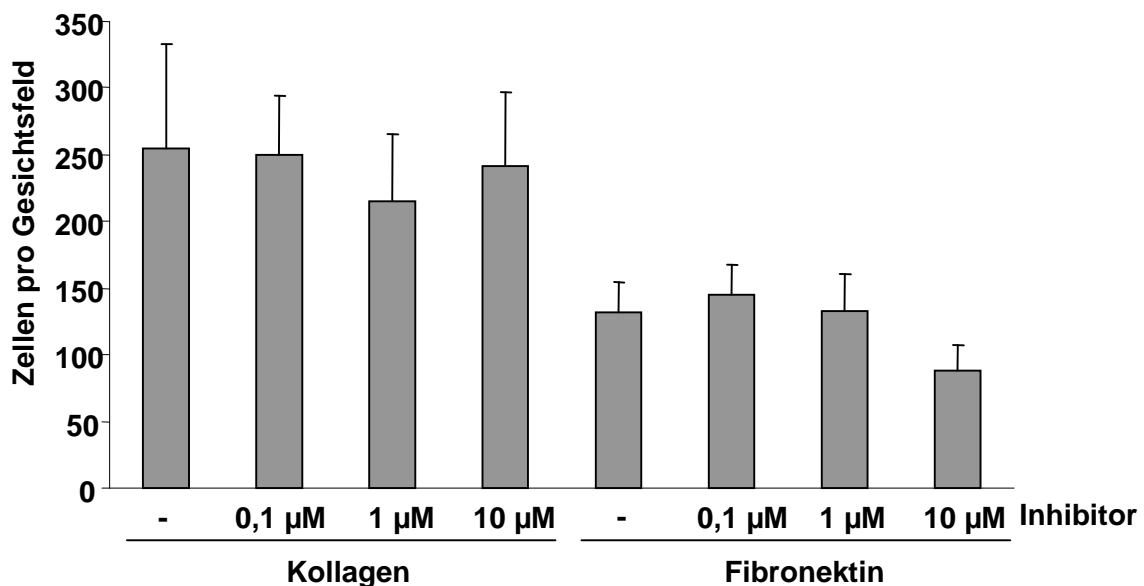


Abb. 24 Adhäsion der GMZ auf Kollagen und Fibronektin mit Inhibitor

Die Zellen wurden wie im Versuch zuvor beschrieben behandelt. Die Oberflächen wurden über Nacht mit Kollagen und Fibronektin in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ beschichtet. Der Inhibitor wurde in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Anzahl der pro Gesichtsfeld auf den Oberflächen adhärerten Zellen wurde bei 100 x Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Es wurden 5 Felder pro Vertiefung für 3 Vertiefungen pro Ansatz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

4. Ergebnisse

Dargestellt sind die Mittelwerte mit der berechneten Standardabweichung der pro Gesichtsfeld in den verschiedenen Ansätzen adhären GMZ. Bei einer Proteinkonzentration von 20 µg/ml hefteten sich in Abwesenheit des Inhibitors etwa 250 GMZ an die mit Kollagen beschichtete Oberfläche und etwa 130 GMZ an den mit Fibronectin beschichteten Untergrund. Cilengitide konnte die Adhäsion der GMZ auf den EZM Proteinen Kollagen und Fibronectin bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml kaum beeinflussen. Bis zu dieser Inhibitormenge kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Anzahl der adhären Zellen auf diesen Proteinen. Die Anzahl der an die Kollagen beschichtete Oberfläche gebundenen GMZ blieb mit etwa 250 bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM gleich, während die an Fibronectin angeheftete Zellzahl bei dieser Konzentration auf etwa 90 GMZ pro Gesichtsfeld absank.

4.4 Boyden Kammer Migrationsversuche

Die Untersuchung der Zellmigration sollte die, in Bezug auf die Restenoseätiologie, entscheidenden funktionellen in vitro Ergebnisse liefern. Bisher wurden die intrazelluläre Signale untersucht und die Zelladhäsion auf verschiedenen Proteinen analysiert. Der Einfluss des α_v Integrininhibitor wurde dargestellt. Nun sollte untersucht werden, in wie weit die EZM Proteine Vitronektin, Fibronektin und Kollagen in der Lage sind eine Zellwanderung zu stimulieren und ob Cilengitide das Potenzial besitzt, die durch diese Proteinen evtl. stimulierte Migration zu inhibieren.

4.4.1 Migration der Gefässmuskelzellen unter Stimulation mit dem Protein

Vitronektin

Es wurde initial untersucht, in welchem Ausmass das Protein Vitronektin in verschiedenen Konzentrationen in der Lage ist die Zellmigration zu stimulieren.

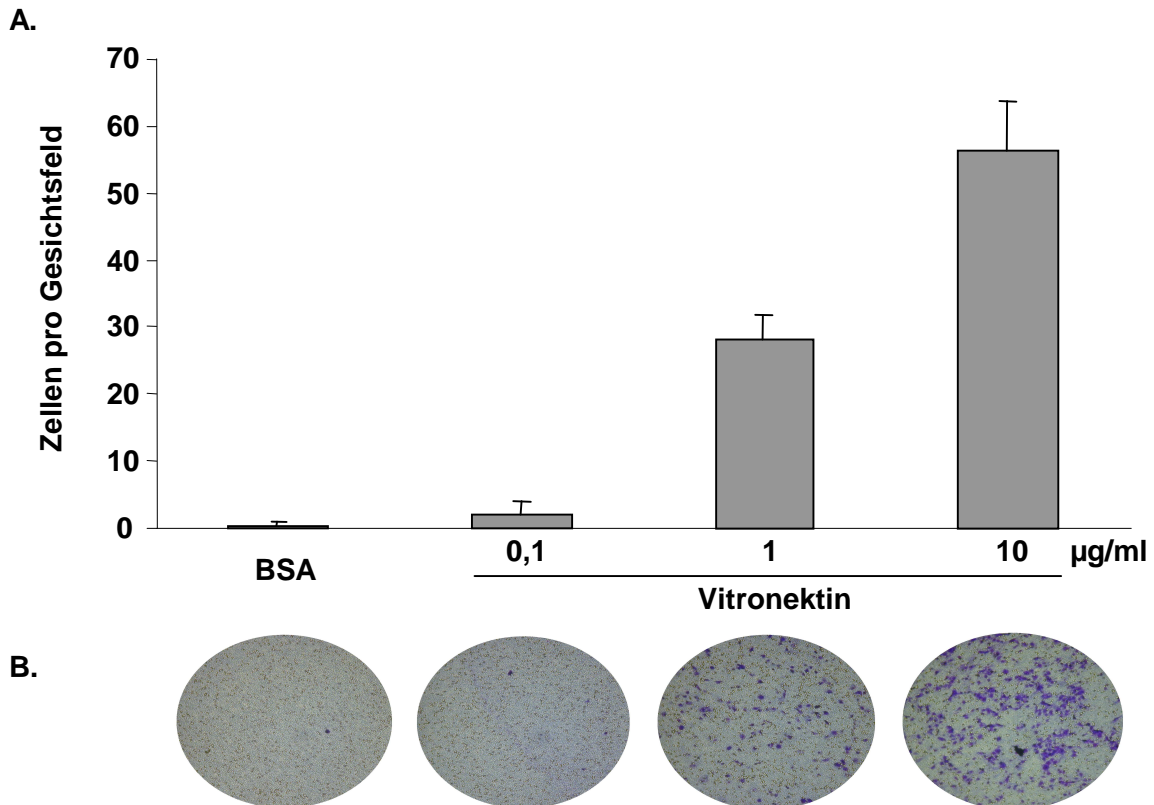


Abb. 25 Zellmigration bei Vitronektin Stimulation

Die GMZ wurden über Nacht mit einem serumarmen Medium inkubiert. Beschichtet wurden die Migrationskammern auf der Unterseite mit Vitronektin in den angegebenen Konzentrationen, verdünnt in Suspensionsmedium, wobei bei einer Kammer nur das Medium ohne Protein (BSA) als Kontrolle verwendet wurde. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Suspension gebracht. 1×10^5 Zellen wurden pro Migrationskammer in das innere Kompartiment ausgebracht. Nach 24 h wurden die in diesem Teil der Kammer zurückgebliebenen GMZ mit einem Wattestäbchen entfernt und die auf die Membranunterseite migrierten Zellen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Bei einer 200 x Vergrößerung wurde die Anzahl der gewanderten GMZ in 5 Feldern pro Kammer und 2 Kammern pro Ansatz bestimmt.

- A. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der gewanderten Zellen
- B. Mikroskopaufsicht auf die migrierten, violett angefärbten Zellen

4. Ergebnisse

In Teil A der Abbildung sind die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen der Anzahl der auf die Membranunterseite migrierten GMZ bei Stimulation durch Vitronektin in den angegebenen Konzentrationen dargestellt. In einem Ansatz wurde die Unterseite der Boyden Kammer als Kontrolle nicht mit Vitronektin beschichtet (BSA). Man kann erkennen, dass es dort zu keiner Migration der GMZ auf die Membranunterseite kam. Vitronektin war in einer Konzentration von 0,1 µg/ml kaum in der Lage die GMZ zu einer Migration zu stimulieren. Im Vergleich mit der Kontrolle konnte kein signifikanter Anstieg der gewanderten Zellen festgestellt werden. Eine Konzentration von 1 µg/ml führte zu einer deutlichen Zellmigration durch die Membranporen. Etwa 28 GMZ konnten pro Gesichtsfeld gezählt werden. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml stieg die Anzahl auf etwa 55 Zellen an.

4.4.2 Stimulation der Migration durch Vitronektin, Kollagen und Fibronektin

Der vorangehende Versuch zeigte, dass das EZM Protein Vitronektin einen guten Stimulus darstellt, um die Zellen zu einer Migration anzuregen. Es stellte sich die Frage, ob auch die beiden anderen zuvor verwendeten Proteine Fibronektin und Kollagen hierzu in der Lage sind.

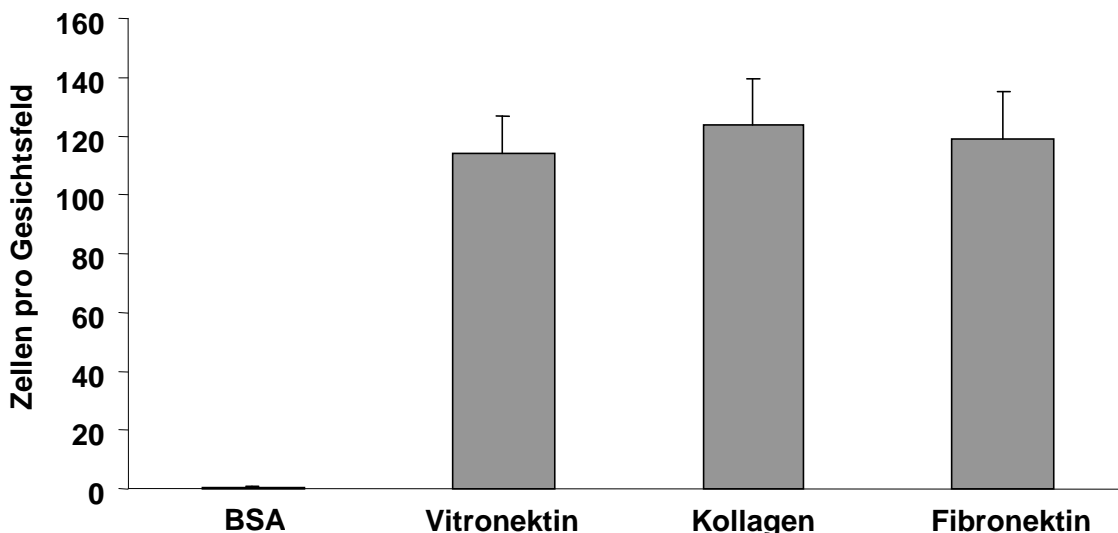


Abb.26 Stimulation der Migration durch Vitronektin, Kollagen und Fibronektin

Die GMZ wurden behandelt wie in dem Versuch zuvor beschrieben. Die Kammern wurden auf der Unterseite mit Vitronektin, Fibronektin oder Kollagen in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet. Ein Kontrollansatz hatte keine Proteinbeschichtung (BSA). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der bei einer 200 x Vergrößerung bestimmten Anzahl der gewanderten GMZ. Es wurden 5 Feldern pro Kammer und 2 Kammern pro Ansatz ausgezählt.

4. Ergebnisse

In der Grafik sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen der pro Gesichtsfeld gewanderten GMZ zu erkennen. In der BSA Kontrolle ohne Proteinbeschichtung kam es zu keiner Zellmigration. Die EZM Proteine Vitronectin, Kollagen und Fibronectin waren in einer Konzentration von 5 µg/ml annähernd gleich stark in der Lage die GMZ zu einer Migration auf die Membranunterseite anzuregen. In allen drei Ansätzen konnten etwa 110 – 120 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt werden.

4.4.3 Einfluss des Inhibitors Cilengitide auf die durch Vitronektin induzierte Migration

In den sich anschliessenden Versuchen sollte geprüft werden, ob die durch Stimulation mit verschiedenen Proteinen induzierte Wanderung der Zellen unter dem Einfluss des α_v Integrininhibitors verhindert werden kann. Zuvor hatte der Inhibitor die intrazelluläre PTyr und die Adhäsion der Zellen auf Vitronektin deutlich verringern können. Um den Einfluss von Cilengitide auf die Migration zu untersuchen, wurden die Kammern auf der Membranunterseite mit Vitronektin beschichtet und der Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen sowohl dem inneren als auch dem äusseren Kompartiment der Versuchsanordnung hinzugefügt.

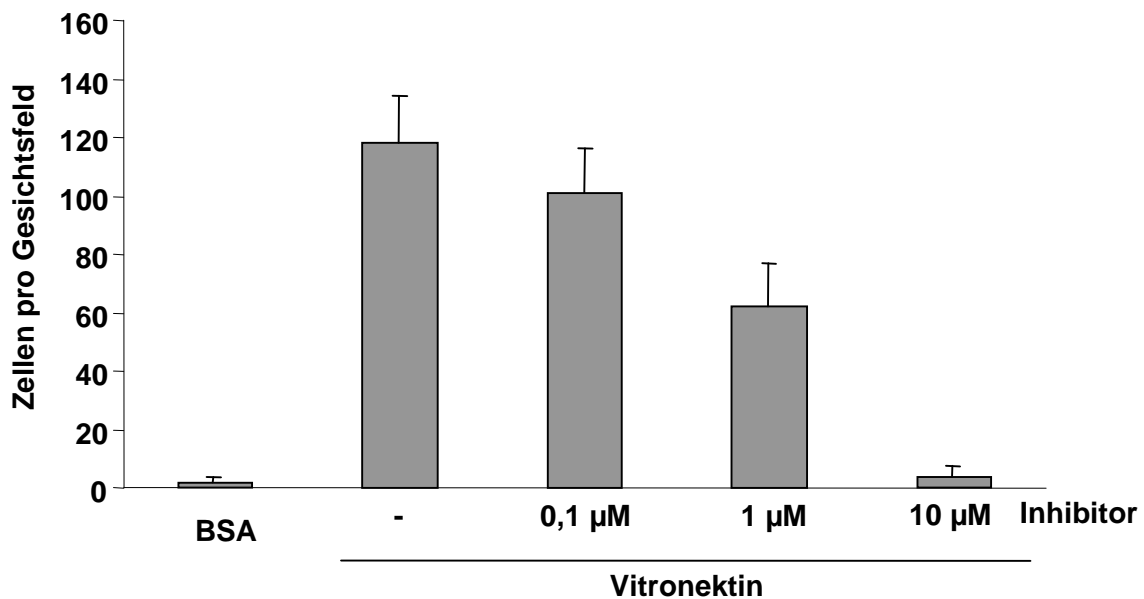


Abb. 27 Einfluss von Cilengitide auf die Zellmigration bei Vitronektin Stimulation
Die GMZ wurden wie im Versuch zuvor beschrieben behandelt. Beschichtet wurden die Migrationskammern mit 5 µg/ml Vitronektin verdünnt in Suspensionsmedium, wobei bei einem Ansatz als Kontrolle nur das Suspensionsmedium ohne Protein (BSA) verwendet wurde. Der Inhibitor wurde sowohl der Zellsuspension im inneren Kompartiment, als auch dem reinen Suspensionsmedium im äusseren Kompartiment der Versuchsanordnung in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Bei einer 200 x Vergrösserung wurde die Anzahl der gewanderten GMZ in 5 Feldern pro Kammer und 2 Kammern pro Ansatz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

4. Ergebnisse

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte zusammen mit den berechneten Standardabweichungen der migrierten GMZ dargestellt. Ein Ansatz ohne Proteinbeschichtung diente als Kontrolle (BSA). Hier konnte keine Wanderung beobachtet werden. Eine Stimulation durch 5 mg/ml Vitronektin führte zu einer Migration von etwa 120 GMZ. Der Inhibitor konnte in einer Konzentration von 0,1 µg/ml die Anzahl auf etwa 100 Zellen senken, was in Anbetracht der Standardabweichung jedoch nicht als signifikant bezeichnet werden kann. Eine Konzentration von 1 µM war in der Lage die Menge der gewanderten GMZ auf ca. 60 abzusinken, was etwa 50 % des Ausgangswertes beträgt. Bei 10 µM Cilengitide wurde die durch Vitronektin induzierte Haptotaxis der GMZ vollständig inhibiert und sank auf einen dem Kontrollansatz entsprechenden Wert ab.

4.4.4 Cilengitide Wirkung bei Stimulation der Migration durch Kollagen bzw. Fibronektin

In den Versuchen zuvor wurde deutlich, dass auch Fibronektin und Kollagen in der Lage sind die GMZ zu einer Wanderung, die vergleichbar zu einer Stimulation durch Vitronektin ist, anzuregen. Es konnte gezeigt werden, dass Cilengitide die induzierte FAK PTyr durch Adhäsion der GMZ auf Fibronektin und Kollagen nicht so deutlich wie bei Vitronektin Adhäsion verhindern konnte. Auch die Anheftung der Zellen auf diesen Proteinen konnte der Inhibitor nicht im selben Ausmass wie bei der Adhäsion auf Vitronektin hemmen. Es sollte analysiert werden, in wieweit die α_v Integrinblockade die durch Fibronektin und Kollagen stimulierte Migration verhindern kann.

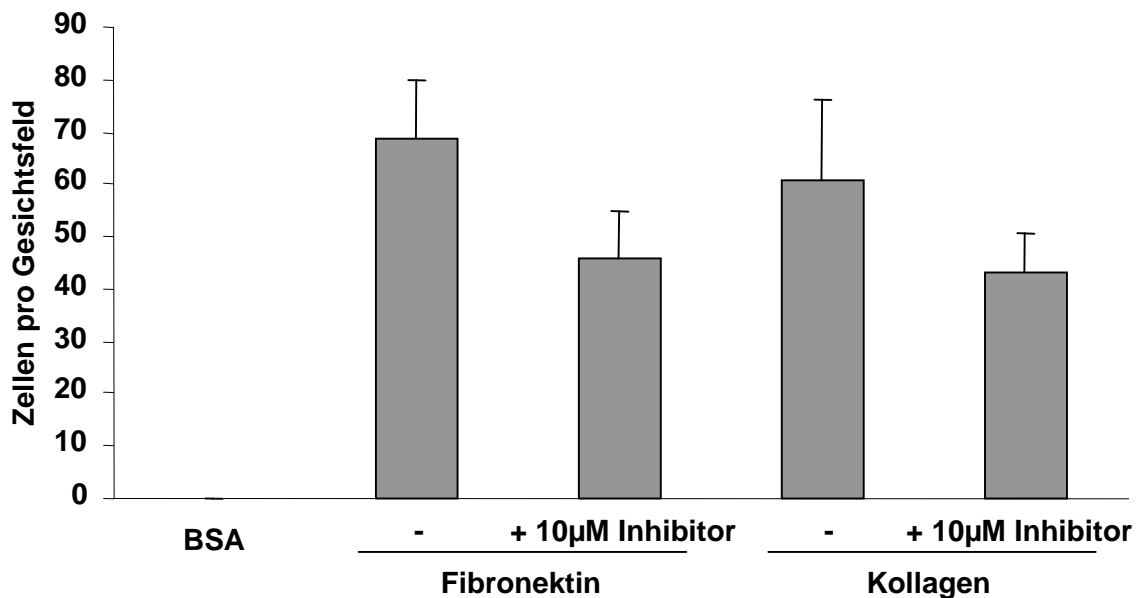


Abb. 28 Cilengitide Wirkung bei Fibronektin und Kollagen Haptotaxis

Die GMZ wurden wie in den Versuchen zuvor behandelt. Beschichtet wurden die Migrationskammern mit Fibronektin und Kollagen verdünnt in Suspensionsmedium in Konzentration von 5 µg/ml, wobei bei einem Ansatz nur das Suspensionsmedium ohne Protein (BSA) verwendet wurde. Der Inhibitor wurde sowohl der Zellsuspension im inneren Kompartiment, als auch dem reinen Suspensionsmedium im äusseren Kompartiment der Versuchsanordnung in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Bei einer 200 x Vergrößerung wurde die Anzahl der gewanderten GMZ unter dem Phasenkontrastmikroskop in 5 Feldern pro Kammer und 2 Kammern pro Ansatz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

In dieser Grafik sind die Ergebnisse der fünf verschiedenen Ansätze dieses Versuchs dargestellt. Als Kontrolle dient, wie in den Versuchen zuvor, eine Migrationskammer,

4. Ergebnisse

die nicht mit einem Protein beschichtet wurde (BSA). Hier kam es zu keiner Zellmigration. Weiterhin gab es jeweils zwei Ansätze mit Fibronectin- bzw. Kollagenbeschichtung der Membranunterseite, wobei jeweils einem Ansatz Inhibitor in einer Konzentration von 10 μM zugesetzt wurde. Ohne den Hemmstoff konnten bei einer Beschichtung mit Fibronectin etwa 70 Zellen und bei einer Kollagenbeschichtung etwa 60 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt werden. Cilengitide konnte bei einer Konzentration von 10 μM die Anzahl der gewanderten Zellen im Fibronectin- und im Kollagenansatz auf etwa 45 Zellen absenken. Dies entspricht einer Reduktion der Zellmigration von jeweils etwa 30 %.

5. Diskussion

Durch den Nachweis der Expression des Proteins „SMC Actin“ in den Zellen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass es sich bei den kommerziell erworbenen Zellen um glatte Gefäßmuskelzellen handelt. Fibroblasten enthalten einen anderen Aktin Subtyp, der von dem verwendeten spezifischen Antikörper nicht erkannt wird. Der Nachweis der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf der Oberfläche der Schweine GMZ stellte eine Voraussetzung für die Wirkung von Cilengitide dar. Der Hemmstoff wirkt, laut Charakterisierung durch den Hersteller, über α_v Integrinrezeptoren. Die Integrine lagen in den Zellfärbungen an die Enden der Aktinfasern assoziiert vor. Diese Verknüpfung zwischen der extrazellulären Matrix über Integrine zu den Aktinfasern ist nicht nur für die Zelladhäsion auf einer Oberfläche, sondern auch bei dynamischen Vorgängen, wie der Migration von Zellen bedeutsam [25]. Die Migration von glatten Muskelzellen nimmt in der Pathophysiologie der Restenoseentstehung eine Schlüsselrolle ein [17, 18]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der α_v Integrininhibitor Cilengitide, der ein kleines zyklisches Peptid darstellt und für einen Medikamente-freisetzenden Stent verwendet werden kann, in der Lage ist, diese Wanderung zu hemmen. Der Einfluss des Hemmstoffes war am grössten bei einer Stimulation der GMZ durch das EZM Protein Vitronektin. Auch bei Verwendung von Fibronektin und Kollagen konnte Cilengitide die Migration um etwa 30 % verringern. Die Adhäsion der GMZ wurde auf Vitronektin bei 10 μ M fast vollständig, auf Fibronektin und Kollagen nicht inhibiert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Inhibitor die Induktion intrazellulärer Signale nach Stimulation mit den drei genannten Proteinen verhindert bzw. deutlich verringern kann. Die erhöhte PTyr war ausserdem nicht zu beobachten, wenn die GMZ ohne spezifische Rezeptor-Ligand Interaktion auf Poly-L-Lysin adhärirten. Auch konnte demonstriert werden das die PTyr eines ca. 116 kDa Proteins, das als FAK identifiziert wurde, bei der Signaltransduktion eine Hauptrolle einzunehmen scheint. Die Phosphorylierung der focal adhesion kinase, die auf eine Aktivierung dieser Proteinkinase hinweist, wurde unter Einfluss des α_v Integrininhibitor Cilengitide signifikant vermindert. Es wurde die PTyr am Aminosäurerest 397 untersucht, der die Autophosphorylierungsstelle der Kinase darstellt [37]. Diese Kinase stellt einen wichtigen Regulator der Zellmigration

und -invasion dar [38]. Der schwächere Einfluss des Inhibitors auf Migration und Signaltransduktion bei Fibronectin bzw. Kollagen Stimulation, wie auch bei der Adhäsion der GMZ auf diesen Proteinen, kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass diese Eiweiße zusätzlich mit anderen Integrinrezeptoren interagieren können. Vitronectin stellt lediglich einen Liganden für α_V Dimere, darunter $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$ dar. Kollagen dagegen bindet an viele verschiedene Integrinrezeptoren, darunter $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$. Auch Fibronectin kann mit zahlreichen Integridimeren wie $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_6$ und $\alpha_V\beta_8$ interagieren [23]. Ob diese Rezeptoren auf den GMZ exprimiert werden, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht untersucht. Somit ist anzunehmen, dass die Blockade der α_V Integrine über andere Dimere dieser Rezeptorfamilie bei den Versuchen mit den Proteinen Fibronectin und Kollagen teilweise kompensiert werden konnte. Trotzdem wurde durch die α_V Blockade auch die Signaltransduktion bzw. Migration, die über andere Dimere vermittelt wird, abgeschwächt. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der α_V Integrine bei diesen Prozessen. Wahrscheinlich ist es auch auf die Kompensation durch andere Integridimere zurückzuführen, dass unter der Wirkung des Inhibitors die Zellen keinem apoptotischen Zelltod unterlaufen. In der Kultivierung der GMZ mit 10 μM Inhibitor kam es zwar zu einer Verkleinerung des Zelldurchmessers, einer Verringerung der intrazellulären P_{Tyr} und einem Abbau des Aktinzytoskeletts, die Zellen blieben jedoch adhären und vital. Laut Hersteller ist durch eine andere Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass bis zu einer Cilengitide Konzentration von 100 μM keine Apoptose bei glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen aus humanen Koronararterien induziert wird [39]. Die wichtige Rolle des EZM Proteins Vitronectin konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden. Sie stellten fest, dass VN nach Gefäßverletzung in einem Rattenmodell hochreguliert wird und wahrscheinlich v.a. dieses Protein für die Migration von GMZ und die Neointimaentstehung verantwortlich ist [40]. Die Induktion der Migration und der intrazellulären Signalkaskaden durch dieses, wie die Adhäsion auf diesem Protein konnte Cilengitide in den Versuchen fast vollständig verhindern. Obwohl verschiedene Studien eine Beteiligung der α_V Integrine, im besonderen des $\alpha_V\beta_3$ Integrins, bei der Entwicklung einer Restenose und der Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in vitro und in vivo nahe legen [14, 31, 32, 34, 35, 41], bleibt unklar, wie die Blockade dieser EZM Rezeptoren zu einer Inhibition

der Wanderung von GMZ führt. Unsere Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Rolle der Integrin vermittelten Signalkaskaden in der Regulation der Migration von GMZ hin. Hierbei stand die Phosphorylierung von FAK im Vordergrund. Die Bedeutung dieser Proteinkinase konnte schon für die Migration anderer Zellarten, wie Fibroblasten [42], Endothel- [43] und Epithelzellen [44] gezeigt werden. Durch die Bindung von Integrinrezeptoren an Proteine der EZM wird FAK aktiviert und es kommt zu einer Autophosphorylierung der Kinase am Tyrosinrest 397. Hierdurch wird eine Assoziation dieses Proteins mit c-Src über SH2 Domänen und in der Folge eine Rekrutierung weiterer Proteine an diesen Komplex initiiert [45]. Die Aktivität dieses Proteinkomplex scheint eine kritische Rolle in dem dynamischen Prozess des Auf- und Abbaus von fokalen Adhäsionen zu spielen, der für die Migration von Zellen essentiell ist. So kann die deutliche Verminderung der pTyr an den fokalen Kontaktstellen und die Hemmung der FAK Phosphorylierung am Tyrosinrest 397, v.a. bei einer Stimulation durch Vitronektin, den Einfluss des Integrininhibitors auf die Zellmigration zu erklären helfen. Interessanterweise konnte durch andere Gruppen gezeigt werden, dass beispielsweise eine Verhinderung der Integrin Bindung auch Einfluss auf die durch Wachstumsfaktoren induzierten Signale nimmt. Eine effiziente Stimulation von zellulären Signalen durch Wachstumsfaktoren war nur bei einer Bindung von Integrinen an Liganden zu beobachten [46]. Die Unterbrechung der Integrinbindung führte zu einer ineffizienten Stimulation durch Wachstumsfaktoren bis hin zu einer vollständigen Unterdrückung, wie sie beispielsweise bei suspendierten Zellen beobachtet wurde [47]. Ausserdem können Rezeptoren für PDGF mit $\alpha_v\beta_3$ Integrinen assoziiert vorliegen, was zu einer Verstärkung der durch PDGF Stimulation induzierten Signale führt [48]. Die „focal adhesion kinase“ soll als molekulare Verbindung zwischen den durch Wachstumsfaktorrezeptoren und den durch Integrinen vermittelten Signalen dienen. FAK liegt nicht nur an die fokalen Adhäsionen, die reich an Integrinen sind, assoziiert vor [49], sondern konnte auch als Komplex mit Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem EGF oder PDGF Rezeptor, nachgewiesen werden [50]. Ein Komplex aus dem PDGF Rezeptor und FAK konnte bei GMZ aus der Ratte nach PDGF Stimulation nachgewiesen werden. Die Hemmung der FAK Aktivierung durch die Überexpression eines endogenen FAK Inhibitors namens FRNK, was „FAK related non kinase“ bedeutet, konnte diese Komplexbildung und die Migration dieser Zellen verhindern

[51]. Also kann man folgern, dass der α_v Integrininhibitor Cilengitide nicht nur in der Lage sein könnte die durch EZM Proteine stimulierte Haptotaxis, sondern auch die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Chemotaxis zu hemmen. Dies konnte in unserer Arbeitsgruppe an humanen GMZ bei Stimulation durch Vitronektin bzw. PDGF gezeigt werden. Der Inhibitor konnte in beiden Fällen eine Migration der Zellen vermindern. In vivo findet eine Migration von Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung statt und die Zellen müssen hierbei verschiedene Barrieren der EZM überwinden. In vitro kann durch die Bestimmung der Invasion von Zellen in eine Matrix namens Matrigel, die kommerziell erworben werden kann, die dreidimensionale Migration simuliert werden. Die humanen GMZ waren in der Lage die Matrigel Barriere in Boyden Kammer Migrationsversuchen zu überwinden und auf die Unterseite der Kammer zu wandern. Diese Invasion konnte durch den Einsatz von Cilengitide gehemmt werden. Die Hemmung korrelierte mit einer verminderten Sekretion der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) [52]. Der Einfluss dieser Proteinase auf die Invasivität von Mäuse GMZ war zuvor beschrieben worden [53]. Auch bei in vivo Experimenten war MMP-2 bei der Neointimaentstehung nach Ligation der A. carotis deutlich verstärkt exprimiert. In diesem Modell zur Restenoseentstehung zeigten MMP-2 knock out Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine deutlich verminderte Intimahyperplasie, was vermuten lässt, dass diese Proteinase eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Restenoseentstehung spielt [54]. Die Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Verbindung zwischen der Blockade der α_v Integrine und der Sekretion von MMP-2 und legen nahe, dass die Stimulation der GMZ durch Vitronektin nicht nur die Motilität sondern auch die Invasivität dieser Zellen beeinflusst. Es war zuvor gezeigt worden, dass von FAK abhängige Signalkaskaden bei transformierten Mausfibroblasten und humanen Karzinomzellen wichtig für die Invasivität sind, indem sie zu einer Expression von MMP-2 führen [55-57]. Die Hemmung der α_v Integrinbindung an die Liganden und hierdurch die Verminderung der FAK Aktivierung können die Expression von MMP-2 und in der Folge die Invasivität der humanen GMZ beeinflussen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Ergebnisse die Schlüsselrolle der α_v Integrine in der Motilität und Migration von GMZ unterstreichen. Sie nehmen Einfluss auf Signalkaskaden, die von FAK abhängig sind und die Haptotaxis zu regulieren scheinen. Diese Ergebnisse machen die α_v Integrine zu einem vielversprechenden

5. Diskussion

Angriffspunkt, um eine Restenose nach Stentimplantation zu verhindern. Der Einsatz des α_v Integrininhibitors Cilengitide, der mit einem Medikamente-freisetzenden Stent lokal an dem Ort des pathologischen Geschehens appliziert werden kann, lässt somit eine weitere Reduktion der Restenoserate erhoffen, was in einem nächsten Schritt mittels eines in vivo Modells untersucht werden muss.

6. Zusammenfassung

Die ischämische Herzerkrankung (Angina pectoris, Herzinfarkt), eine führende Todesursache in den Industrienationen, wird hauptsächlich durch Intervention an den Koronararterien mittels Ballondilatation meist in Kombination mit einer Stentimplantation behandelt. Trotz aktueller Verbesserungen im Stentdesing und dem Einsatz von medikamente-freisetzenden Stents kommt es immer noch in etwa 10 – 20 % der Interventionen, in Abhängigkeit des jeweiligen Risikoprofils, zu der Entwicklung einer Restenose. Der pathophysiologische Prozess der Neointimaentwicklung, welche der Restenoseentstehung nach Stentimplantation zu Grunde liegt, ist im Wesentlichen durch einwandernde glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) bedingt. Eine zentrale Rolle bei der Zellwanderung nehmen α_v Integrine ein. Um den Prozess der Restenose zu verhindern, stellen somit diese Rezeptoren und die durch sie ausgelösten Signalkaskaden einen vielversprechenden Angriffspunkt dar.

Wir konnten nach Stimulation von GMZ aus Schweinen mit den EZM Proteinen Vitronektin (VN), Fibronektin (FN) und Kollagen (CN) eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung (PTyr) v.a. eines etwa 116 kDa grossen Proteins zeigen, das mittels Immunpräzipitation als “focal adhesion kinase” (FAK) identifiziert wurde. VN stellte hierbei den stärksten Stimulus dar. Die erhöhte PTyr zeigte sich am Tyrosinrest 397 von FAK (PTyr-397), der Autophosphorylierungsstelle der Kinase, und deutet damit auf eine durch Proteinstimulation induzierte, erhöhte Aktivität von FAK hin. Die erhöhte PTyr von FAK war nicht zu beobachten, wenn die GMZ ohne spezifische Rezeptor-Ligand Interaktion auf Poly-L-Lysin adhärten. Die Aktivierung von FAK nach Stimulation mit VN, FN und CN war dabei abhängig von α_v Integrinen und lies sich durch Zugabe eines kompetitiven α_v Inhibitors in einer Dosis- abhängigen Weise unterdrücken. Die Inhibition war am deutlichsten nach VN Stimulation zu beobachten. Bei Kultivierung der Zellen mit dem Inhibitor über 7 Tage in einer Konzentration von 1 μ M war in der Durchlichtmikroskopie im Vergleich zu kultivierten Zellen ohne Inhibitor keine Veränderung zu erkennen. Bei 10 μ M Cilengitide verkleinerte sich der Zelldurchmesser, die Zellen blieben jedoch an der Oberfläche der Zellkulturschalen adhären. In der IF Mikroskopie zeigte sich nach 30 min eine Abnahme der intrazellulären PTyr und ein Abbau des Aktinzytoskeletts unter Einfluss von 10 μ M des Inhibitors auf kultivierte adhärente GMZ. Es gab keinen Hinweis auf Induktion einer

Apoptose. Auf VN und CN konnten die zuvor suspendierten GMZ gut adhären, während auf einer mit FN beschichteten Oberfläche die Anzahl der angehefteten Zellen im Vergleich zu einer unbeschichteten Oberfläche nicht anstieg. Die Adhäsion der GMZ auf VN konnte der Hemmstoff stark vermindern, während er auf die Adhäsion auf FN und CN keinen Einfluss hatte. Die Inhibition der Aktivierung von FAK durch den α_v Integrininhibitor korrelierte mit der Reduktion der durch die Proteinen stimulierten Migration (Haptotaxis) der primären GMZ. Der Inhibitor führte bei einer Konzentration von 10 μM bei VN Stimulation zu einer fast vollständigen Inhibition der Haptotaxis, während er nach FN bzw. CN Stimulation die Anzahl der gewanderten Zellen bei dieser Konzentration um etwa 30 % verringerte. Die Migrationsrate wurde mit Hilfe eines modifizierten Boyden-Kammer Migrationsversuchs ermittelt.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle der α_v Integrine in der Motilität von GMZ. Sie nehmen Einfluss auf Signalkaskaden, die von FAK abhängig sind und die Haptotaxis zu regulieren scheinen. Diese Ergebnisse machen die α_v Integrine zu einem vielversprechenden Angriffspunkt, um eine Restenose nach Stentimplantation zu verhindern. Der Einsatz des α_v Integrininhibitors Cilengitide, der mit einem Medikamente-freisetzenden Stent lokal an dem Ort des pathologischen Geschehens appliziert werden kann, lässt somit eine weitere Reduktion der Restenoserate erhoffen, was in einem nächsten Schritt mittels eines in vivo Modells untersucht werden muss.

.

7. Literaturverzeichnis

1. WHO, *The World health report: 2003 shaping the future*. 2003. p. 1-22.
2. Herold, G., *Herold - Innere Medizin 2003*. 2003. p. 196-217.
3. Hamm C. W., e.a., *Akutes Koronarsyndrom (ACS)*, in *Pocket-Leitlinien*. 2004, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V.
4. Hombach, V., *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie*, in *Schattauer Verlagsgesellschaft mbH*. 2001. p. 91-125.
5. van Buuren E., M.H., Horstkotte D., *20. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland*. *Z Kardiol*, 2005. **94**(3): p. 212-215.
6. Medtronic, <http://www.medtronic.de/germany/patients/CAD/stenting.html>. 2001 - 2002.
7. Serruys, P.W., et al., *Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months*. *Circulation*, 1988. **77**(2): p. 361-71.
8. Nobuyoshi, M., et al., *Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients*. *J Am Coll Cardiol*, 1988. **12**(3): p. 616-23.
9. Fischman, D.L., et al., *A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(8): p. 496-501.
10. Macaya, C., et al., *Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: one-year clinical follow-up of Benestent trial. Benestent Study Group*. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **27**(2): p. 255-61.

7. Literaturverzeichnis

11. Woods, T.C. and A.R. Marks, *Drug-eluting stents*. *Annu Rev Med*, 2004. **55**: p. 169-78.
12. Rutanen, J., J. Markkanen, and S. Yla-Herttuala, *Gene therapy for restenosis: current status*. *Drugs*, 2002. **62**(11): p. 1575-85.
13. Corjay, M.H., et al., *alphavbeta3, alphavbeta5, and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation*. *J Cell Biochem*, 1999. **75**(3): p. 492-504.
14. Panda, D., et al., *Potential roles of osteopontin and alphaVbeta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(17): p. 9308-13.
15. Hoshiga, M., et al., *Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery*. *Circ Res*, 1995. **77**(6): p. 1129-35.
16. Mousa, S.A., *Vitronectin receptors in vascular disorders*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002. **3**(8): p. 1191-5.
17. Virmani, R. and A. Farb, *Pathology of in-stent restenosis*. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(6): p. 499-506.
18. Schwartz, R.S. and T.D. Henry, *Pathophysiology of coronary artery restenosis*. *Rev Cardiovasc Med*, 2002. **3 Suppl 5**: p. S4-9.
19. Kipshidze, N., et al., *Update on sirolimus drug-eluting stents*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(4): p. 337-48.
20. Virmani, R., et al., *Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious?* *Circulation*, 2004. **109**(6): p. 701-5.
21. Virmani, R., F.D. Kolodgie, and A. Farb, *Drug-eluting stents: are they really safe?* *Am Heart Hosp J*, 2004. **2**(2): p. 85-8.

7. Literaturverzeichnis

22. Ärzteblatt, D., *US-Experten: Mehr als 2000 Todesfälle pro Jahr durch Medikamenten Stents*. 2006.
23. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res, 2001. **305**(3): p. 285-98.
24. Critchley, D.R., *Focal adhesions - the cytoskeletal connection*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 133-9.
25. Petit, V. and J.P. Thiery, *Focal adhesions: structure and dynamics*. Biol Cell, 2000. **92**(7): p. 477-94.
26. Hauck, C.R., *Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens*. Med Microbiol Immunol (Berl), 2002. **191**(2): p. 55-62.
27. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
28. Schwartz, M.A., M.D. Schaller, and M.H. Ginsberg, *Integrins: emerging paradigms of signal transduction*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 549-99.
29. Assoian, R.K., *Anchorage-dependent cell cycle progression*. J Cell Biol, 1997. **136**(1): p. 1-4.
30. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
31. Srivatsa, S.S., et al., *Selective alpha v beta 3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin alpha v beta 3 and osteopontin expression during neointima formation*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(3): p. 408-28.
32. Baron, J.H., et al., *Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by c7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(3): p. 464-72.

7. Literaturverzeichnis

33. Byzova, T.V., et al., *Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology*. Thromb Haemost, 1998. **80**(5): p. 726-34.
34. Matsuno, H., et al., *Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation*. Circulation, 1994. **90**(5): p. 2203-6.
35. Bishop, G.G., et al., *Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit*. Circulation, 2001. **103**(14): p. 1906-11.
36. Christen, T., et al., *Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery*. Circulation, 2001. **103**(6): p. 882-8.
37. Schaller, M.D., *The focal adhesion kinase*. J.Endocrinol, 1996. **150**: p. 1-7.
38. Hauck, C.R., D.A. Hsia, and D.D. Schlaepfer, *The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion*. IUBMB Life, 2002. **53**(2): p. 115-9.
39. K. Schrör, R.P., *Cilengitide - Wirkung auf Migration, Proliferation, Apoptose und Expression von $\alpha V\beta 3$ Integrinen in glatten Muskel- und Endothelzellen humaner Koronararterien*.
40. Dufourcq, P., et al., *Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 952-62.
41. Sajid, M. and G.A. Stouffer, *The role of alpha(v)beta3 integrins in vascular healing*. Thromb Haemost, 2002. **87**(2): p. 187-93.
42. Sieg, D.J., C.R. Hauck, and D.D. Schlaepfer, *Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt **16**): p. 2677-91.
43. Gilmore, A.P. and L.H. Romer, *Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(8): p. 1209-24.

7. Literaturverzeichnis

44. McLean, G.W., E. Avizienyte, and M.C. Frame, *Focal adhesion kinase as a potential target in oncology*. *Expert Opin Pharmacother*, 2003. **4**(2): p. 227-34.
45. Schlaepfer, D.D., M.A. Broome, and T. Hunter, *Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(3): p. 1702-13.
46. Damsky, C.H. and D. Ilic, *Integrin signaling: it's where the action is*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 594-602.
47. Miyamoto, S., et al., *Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1633-42.
48. Schneller, M., K. Vuori, and E. Ruoslahti, *Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF*. *Embo J*, 1997. **16**(18): p. 5600-7.
49. Klingbeil, C.K., et al., *Targeting Pyk2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(1): p. 97-110.
50. Sieg, D.J., et al., *FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(5): p. 249-56.
51. Hauck, C.R., D.A. Hsia, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(52): p. 41092-9.
52. Varadarajulu, J., et al., *Targeting of alpha(v) integrins interferes with FAK activation and smooth muscle cell migration and invasion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **331**(2): p. 404-12.

7. Literaturverzeichnis

53. Kanda, S., et al., *Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(4): p. 998-1005.
54. Kuzuya, M., et al., *Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia*. *Circulation*, 2003. **108**(11): p. 1375-81.
55. Hauck, C.R., et al., *FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth*. *Embo J*, 2002. **21**(23): p. 6289-302.
56. Hauck, C.R., T. Hunter, and D.D. Schlaepfer, *The v-Src SH3 domain facilitates a cell adhesion-independent association with focal adhesion kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 17653-62.
57. Hsia, D.A., et al., *Differential regulation of cell motility and invasion by FAK*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(5): p. 753-67.

8. Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes koronares Syndrom
AP	Angina pectoris
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CN	Kollagen
DMEM	Dulbeccos´ s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FN	Fibronectin
g	Gramm
GMZ	Gefäßmuskelzellen
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
IHK	Ischämische Herzkrankheit
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
M	Molar
min	Minute
NSTEMI	Myokardinfarkt ohne ST-Hebung
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese

8. Verwendete Abkürzungen

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	PBS mit Zusatz von 0,25 mM MgCl ₂ und 0,35 mM CaCl ₂
pH	pH Wert
PTyr	Tyrosinphosphorylierung
pY397	phosphorylierter Tyrosinrest 397
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
SMGM	Smooth muscle growth medium, synth. Wachstumsmedium
Src	„Sarcoma producing protein“
STEMI	Myokardinfarkt mit ST-Hebung
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VN	Vitronektin
WB	Western Blot

Danksagung

An dieser Stelle wird es Zeit, vielen Menschen meinen herzlichen Dank auszusprechen. Ich möchte Herrn Prof. Dr. G. Ertl für die Bereitstellung des Promotionsthemas danken. Herrn Prof. Dr. J. Hacker möchte ich danken, dass er mir ermöglichte, die Versuche in seinem Institut, dem Zentrum für Infektionsforschung und dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie in der AG Hauck durchzuführen. Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Strotmann danke ich für die Übernahme des Koreferats. Herrn Prof. Dr. C. Hauck und Herrn Dr. M. Laser möchte ich für die gute Betreuung danken. Herrn Prof. Dr. C. Hauck und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Hilfe bei den Versuchen und den ein oder anderen Tipp, der zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, danken. Mein Dank gilt auch der Firma Merck, im besonderen Herrn Jonczyk für die Bereitstellung des Inhibitors.